

**Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Maximilian Rudert**

**Charakterisierung des Einflusses von Estrogen-
rezeptoren auf mechanoresponsive Reporter**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Lisa Sophie Kramer
aus Heidelberg**

Würzburg, Juni 2020

Referent: Prof. Dr. med. Franz Jakob

Korreferent: Prof. Dr. med. Martin Fassnacht

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08.12.2020

Die Promovierende ist Ärztin

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Knochenaufbau und Signalwege in der Mechanotransduktion	1
1.1.1	Mikrostruktur des Knochens	1
1.1.2	Spezifische Zellen des Knochens und ihre Signalwege	2
1.1.2.1	Osteoblast	2
1.1.2.2	Osteozyt	3
1.1.2.3	Osteoklast	5
1.1.3	Mechanotransduktion und ihre Signalwege	7
1.1.4	Knochenstoffwechsel	12
1.1.4.1	Signalwege im Knochenaufbau	12
1.1.4.2	Signalwege im Knochenabbau	12
1.2	Die Bedeutung der Sexualhormone für den Knochenstoffwechsel	13
1.2.1	Östrogene und Androgene	13
1.2.2	Wirkung von Östrogenen auf den Knochenstoffwechsel	15
1.2.2.1	Östrogenrezeptoren	17
1.2.2.1.1	Östrogenrezeptor α	20
1.2.2.1.2	Östrogenrezeptor β	20
1.2.3	Signalwege von ER α und ER β	24
1.2.3.1	Genomischer Signalweg	24
1.2.3.2	Nicht-genomischer Signalweg	26
1.3	Osteoporose	28
1.3.1	Definition	28
1.3.2	Epidemiologie	28
1.3.3	Ätiologie und Pathogenese	29
1.3.4	Risikofaktoren der Osteoporose	31

Inhaltsverzeichnis

1.3.4.1 Alter und Genetik als Risikofaktoren	31
1.3.4.2 Hormonmangel als Risikofaktor	32
1.3.4.3 Immobilisation und Sturzkrankheit / Frailty	32
1.3.5 Klinik.....	33
1.3.6 Diagnostik.....	34
1.3.7 Therapie	35
1.3.7.1 Basisprogramm.....	35
1.3.7.2 Nicht-medikamentöse Therapie	35
1.3.7.3 Spezifische medikamentöse Therapie	35
1.3.7.4 Operative Therapie	37
1.3.7.5 Sport- und Bewegungstherapie.....	37
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	38
2 Material.....	39
2.1 Geräte.....	39
2.2 Chemikalien	39
2.3 Verbrauchs- und Zellkulturmaterialien.....	40
2.4 Kits.....	40
2.5 Primer	41
2.5.1 Primer zum Nachweis und zur Amplifikation der cDNA.....	41
2.5.2 Primer zur Sequenzierung.....	41
2.5.3 Primer zur Mutagenese	42
2.5.4 Primer zur lentiviralen Überexpression.....	42
2.6 Antikörper Immunzytologie.....	42
2.7 Zellen	42
2.8 Bakterien.....	43
2.9 Vektoren.....	43
2.10 Enzyme	43
2.11 Größenmarker.....	44

Inhaltsverzeichnis

2.12 Lösungen	44
2.13 Nährmedien und Zusätze für die Gewebekultur	45
2.14 Nährmedien und Zusätze für die Bakterienkultur	45
3 Methoden	46
3.1 Zellkultur	46
3.1.1 Kultivierung von Zellen	47
3.1.2 Bestimmung der Zellzahl	47
3.2 Gewinnung von cDNA aus humanen Zellen	48
3.2.1 RNA-Isolation	48
3.2.2 cDNA-Synthese durch Reverse Transkriptase (RT)	48
3.3 Amplifizierung, Analyse und Aufreinigung spezifischer Sequenzen	49
3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	49
3.3.2 Agarose-Gelelektrophorese	51
3.3.3 Extraktion von DNA-Fragmenten	51
3.4 Klonierung von DNA-Fragmenten	52
3.4.1 Gewinnung von DNA-Fragmenten	52
3.4.2 Ligation von DNA-Fragment und Vektor	52
3.4.3 Klonierung der Konstrukte und Etablierung von stabilen hMSC-TERT- Zelllinien i.R. von Dehnungsversuchen	53
3.4.4 Transformation bakterieller Wirte mit rekombinanter DNA	55
3.5 Präparation von Plasmid-DNA	55
3.5.1 Plasmid-Mini-Präparation	55
3.5.2 Plasmid-Maxi-Präparation	56
3.5.3 Photometrische Analysen	56
3.6 DNA-Sequenzierung	57
3.7 Mutagenese	58
3.8 Herstellung stabiler transfizierter Zellen mittels Elektroporation	59
3.8.1 Definition der Elektroporation	60

Inhaltsverzeichnis

3.8.2 Durchführung der Elektroporation („Einbringen von DNA in Zellen“)	60
3.8.3 Herstellung eines linearisierten Plasmids	60
3.9 Versuche mit ER α und HEK293-Zellen	61
3.9.1 Behandlung der ER α - Zellen und ER β - Zellen mit E2 und ICI 182-870	61
3.9.2 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen und Dehnung	62
3.9.3 Transiente Transfektion und Cotransfektion von HEK293-Zellen mittels Lipofektion	62
3.9.4 Herstellung stabiler Klone	64
3.9.5 Lentivirale Überexpression	64
3.9.6 Bioreaktor	65
3.9.7 Herstellung der Zellkulturplatten	66
3.9.8 Zyklische Dehnung von HEK293, hMSC-TERT und primären, mesenchymalen Stammzellen und Luciferase-Assay	67
3.9.9 RT-PCR Analyse des mechanoresponsiven HB-GAM	67
3.10 Immunzytologie	68
3.11 Luciferase Reporter Assay System	69
3.12 Proteinmessung	71
4 Ergebnisse	72
4.1 Klonierungsarbeiten	72
4.1.1 ER β	72
4.1.1.1 Sequenzierung des ER β Klons im pBluescriptR	72
4.1.1.2 Klonierung ER β	72
4.1.2 ER α	74
4.1.2.1 Immunzytochemie	74
4.1.2.2 Lentivirale Überexpression	74
4.1.2.3 Mutagenese	77
4.2 Überprüfung	79
4.2.1 Modulation von ER α - und ER β -Zellen	79

Inhaltsverzeichnis

4.2.2	Charakterisierung von Reportergenkonstrukten mit DNA Response-Elementen nach mechanischer Stimulation.....	81
4.2.2.1	Charakterisierung der stabilen mechanoresponsiven AP1-, SP1-, SP1-SSRE- und ERE-SSRE-Zelllinien	81
4.2.2.2	Ergebnisse der mechanischen Stimulation von primären MSC nach Transduktion von lentiviralen mechanoresponsiven Luciferase-Reporter-Konstrukten.....	84
4.2.2.3	Regulation des mechanoresponsiven Gens HB-GAM	85
4.2.3	Effekte der transienten Überexpression von ER α und ER β auf die Luciferaseaktivität.....	86
5	Diskussion	90
5.1	Probleme bei der Herstellung von Tools	91
5.1.1	ER α	91
5.1.2	Herstellung einer stabilen Zelllinie mit ER β Überexpression	92
5.2	Auswirkungen der Östrogenrezeptoren und von Östradiol auf die Mechanotransduktion und Interaktion von ER α und ER β	93
5.2.1	Modulation von ER α - und ER β - Zellen mittels Östrogen und Antiöstrogen (siehe auch 4.2.1).....	93
5.2.2	Effekte der transienten Überexpression von ER α und ER β auf die Luciferaseaktivität Östrogen-responsiver Elemente (siehe auch 4.2.3).....	94
5.3	Dehnungsversuche	95
5.3.1	Ergebnisse der mechanischen Stimulation von primären MSC nach Transduktion von lentiviralen mechanoresponsiven Luciferase-Reporter-Konstrukten (siehe auch 4.2.2.3).....	95
5.3.2	Charakterisierung der stabilen mechanoresponsiven AP1-, SP1-, SP1-SSRE- und ERE-SSRE Zelllinien (siehe auch 4.2.2.1)	96
6	Zusammenfassung	98
7	Abkürzungsverzeichnis	100
8	Literaturverzeichnis	102

1 Einleitung

1.1 Knochenaufbau und Signalwege in der Mechanotransduktion

1.1.1 Mikrostruktur des Knochens

Als Bestandteil des körperlichen Stützapparates kommt dem Knochengewebe eine sehr wichtige Bedeutung zu. Es ist charakteristischerweise hart und druckfest und weist trotzdem eine gewisse Elastizität auf. Daher dient es einerseits als schützende Wandstruktur für Gehirn, Brusteingeweide und Beckenorgane und fungiert andererseits zusammen mit Bändern und Gelenken als Teil des passiven Bewegungsapparates (Benninghoff & Drenckhahn, 2008). Knochengewebe existiert in zwei verschiedenen Ausführungen, dem Lamellenknochen und dem Geflechtknochen. Geflechtknochen besteht aus einem Flechtwerk an Kollagenfibrillen, das keinem speziellen Organisationsmuster folgt und auch als Faserknochen bezeichnet wird. Während Geflechtknochen vor allem eine große Rolle für die primäre Knochenneubildung bei der Knochenentwicklung und Knochenbruchheilung spielt und im erwachsenen Körper nur noch im Bereich der Schädelsturen, im knöchernen Labyrinth und im Kallusgewebe vorkommt, ist der Lamellenknochen beim adulten Menschen der dominierende Anteil des Knochens. Er entsteht durch sperrholzartige Schichtung verkalkter Knochenmatrix (extrazellulärer Matrix) und ist einer lamellären Ordnung unterworfen (Benninghoff & Drenckhahn, 2008; Migliaccio et al., 2000). Der Lamellenknochen lässt sich in zwei unterschiedliche Organisationsformen unterteilen, den kompakten Knochen und den spongiösen Knochen, wobei dem kompakten Knochen 80% des Knochengewebes des Körpers zugeschrieben werden und dem spongiösen Knochen lediglich 20%. Der kompakte Knochen befindet sich in der Außenschicht des Knochens, der Substantia corticalis und Substantia compacta, und ist ein solider Zellverband ohne Zwischenräume. Die Substantia compacta ist Hauptbestandteil der Diaphysen der langen Röhrenknochen. Der spongiöse Knochen besteht aus einem schwammartigen Gerüst dünner, balkenförmiger Strukturen und befindet sich im Inneren des Knochens. Die Spongiosatrabekel sind platten- bis säulenförmige, verzweigte Strukturen. Aus den Trabekeln entsteht ein gitterförmiges Gerüst, wobei die Trabekel in Richtung der im Knochen herrschenden Zug- und Druckspannungen verlaufen. In den Zwischenräumen der Spongiosa befindet sich das blutbildende Knochenmark (Benninghoff & Drenckhahn, 2008).

1.1.2 Spezifische Zellen des Knochens und ihre Signalwege

Zellen, die spezifisch im Knochen vorkommen und für die Steuerung der Knochenformation und des Knochenumbaus mitverantwortlich sind, sind Osteoblast, Osteozyt und Osteoklast. Hierbei ist der Osteoklast für die Demineralisierung und den Abbau der Knochenmatrix, der Osteoblast und der Osteozyt für die Knochenbildung verantwortlich (Jakob, Benisch, & Ebert, 2010). Die unterschiedlichen Zellen beeinflussen sich jedoch untereinander und sind teilweise auch aufeinander angewiesen. Durch ihre Interaktion gelingt unter anderem ein kontinuierlicher Knochenumbau, bei dem Knochenauf- und Knochenabbau sich die Waage halten und dafür sorgen, dass der Knochen stabil und gesund bleibt (Benninghoff & Drenckhahn, 2008). Hierbei kommt es je nach Zug zu einer unterschiedlichen Reaktion des Knochens. Bei insuffizienter Einwirkung mechanischer Kräfte kommt es zur Knochenresorption, bei physiologischen mechanischen Stimuli zur Aufrechterhaltung der Knochenmasse, bei übermäßiger Einwirkung entweder zum Versagen oder zum verstärkenden Aufbau (Martin, 2000). Hierbei bestimmt die im Gewebe angeborene molekulare Zusammensetzung der Knochenzellen die adaptierte Antwort des Knochens auf mechanische Kräfte. Systemisch wird dieses Wechselspiel über Hormone wie zum Beispiel Östrogene reguliert, lokal übernehmen Zytokine und Wachstumsfaktoren die Rolle der Signalübermittlung. Die einzelnen Knochenzellen weisen zudem Interfaces auf, welche eine lebhaftere Interaktion mit anderen Geweben wie dem Immunsystem oder dem Stoffwechsel erlauben (Jakob et al., 2010). Auf diesem Weg findet beispielsweise auch die Beeinflussung des Knochenstoffwechsels durch Bewegung statt, für dessen Homöostase mechanische Stimuli essentiell sind. Eine gute Kenntnis dieser Interfaces erlaubt daher auch größeres Verständnis der Vorgänge im Knochenstoffwechsel, und folglich eröffnen sich dadurch mehr Angriffspunkte und Möglichkeiten, therapeutisch bei der Osteoporose einzugreifen (Jakob et al., 2010).

1.1.2.1 Osteoblast

Osteoblast und Osteozyt entwickeln sich aus mesenchymalen Vorläuferzellen, auch mesenchymale Stammzellen genannt. Osteoblasten sind im Wesentlichen für die Bildung organischer Matrixkomponenten des Knochens, dem sogenannten Osteoid, verantwortlich und adaptieren die Anatomie des Knochens an die Bedürfnisse des Orga-

Einleitung

nismus (Benninghoff & Drenckhahn, 2008). Sie sind untereinander über unterschiedliche Zellkontakte miteinander verbunden. Hierzu gehören Adhärenskontakte (Cadherin 11 und N-Cadherin), Nexus (Connexin 43) und fleckförmige Occludenskontakte (Maculae occludentes). Eine weitere Funktion der Osteoblasten ist die Bildung verschiedener Zytokine, die auf molekularer Ebene eine wichtige Rolle in der intra- und interzellulären Kommunikation spielen. Hierzu zählt die Bildung von TGF- β , PDGF und IGF-1 u. 2, für welche Osteoblasten Rezeptoren besitzen. Die Sekretion erfolgt autokrin und parakrin. Diese Zytokine stimulieren sowohl die Proliferation von Osteoblasten (Präosteoblasten) als auch die Osteoidbildung (Benninghoff & Drenckhahn, 2008). Des Weiteren werden Interleukine und TNF- α gebildet, welche Osteoklasten aktivieren, und zudem CSF-1 und RANKL (Receptor Activator of NF κ B Ligand). Letztere sind essentielle Differenzierungsfaktoren für die Osteoklasten. Osteoblasten besitzen zudem Rezeptoren für Parathormon, Calcitriol und Retinsäure. Parathormon kann hierbei bei chronisch erhöhtem Spiegel, wie beispielsweise beim Hyperparathyreoidismus, die Osteoidsynthese, Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten inhibieren, wirkt bei medikamentöser kurzfristiger intermittierender Applikation jedoch osteoanabol (Shinoda et al., 2010). Bei kontinuierlicher intensiver Einwirkung induziert es osteoblastäre Mediatoren der Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung und hat somit eine katabole Wirkung auf den Knochen. Im Gegensatz dazu sorgt Calcitriol für eine partielle Stimulation der Osteoblastenaktivität und wirkt auf den Knochen somit strukturaufbauend und strukturerhaltend. Osteoblasten werden sowohl direkt über Belastung aktiviert, was zu einer verstärkten Proliferation und Matrixsynthese führt, als auch indirekt über Wachstumsfaktoren und über das Freisetzen von Prostaglandinen und NO durch Osteozyten, siehe hierzu auch 1.1.3 (Benninghoff & Drenckhahn, 2008).

1.1.2.2 Osteozyt

Bei Osteozyten handelt es sich um terminal differenzierte Osteoblasten, die sich selbst in verkalkte Knochenmatrix einmauern (Jakob et al., 2010). Sie sind in Lakunen eingebettet, welche sich der Form der Osteozyten ideal anpassen und innerhalb welcher sie von Flüssigkeit umgeben sind. Sie stehen über Nexus und Connexin 43 miteinander in Verbindung und bilden somit ein komplexes Netzwerk aus Zell-Zell-Interaktionen (Jakob et al., 2010). Über diese Kontakte können Stoffwechselaktivität und die Fortleitung von Signalen zwischen den einzelnen Osteozyten koordiniert werden (Feng, Szabo, Dziak, & Opas, 2010; Potier, Noailly, & Ito, 2010). Osteozyten machen den

Einleitung

dominierenden Anteil an Zellen im Knochengewebe aus und sind im Bereich des gesamten Knochengewebes präsent (Aguirre et al., 2007). Dies steht im Gegensatz zu Osteoblasten und Osteoklasten, die als Exekutive für Knochenformation und Knochenresorption in kleinen Mengen auf einem begrenzten Anteil (ca. 10%) der Knochenoberfläche an Orten vorhanden sind, die das Remodelling umgehen (Aguirre et al., 2007). Die Ausdehnung des Osteozytennetzwerkes findet über mineralisierte Knochenmatrix, Knochenoberfläche und Knochenmark bis zu den Blutgefäßen statt (Aarden, Nijweide, & Burger, 1994; Aguirre et al., 2007). Ihre strategische Lokalisation erlaubt ihnen das Wahrnehmen (Sensing) von Veränderungen der Einwirkung mechanischer Kräfte durch Dehnung und Flüssigkeits-Scherstress. Durch ihre Fähigkeit, empfangene Signale weiterzuleiten werden die Bewegungen des Knochengewebes in Signale umgesetzt. Durch die Erschütterung auf dem Boden eines mechanischen Reizes kommt es in den Lakunen zu einer Flüssigkeitsströmung, welche von den Osteozyten wahrgenommen wird. Diese sind dann wiederum in der Lage, diese Flüssigkeitsströmungen in zellbiologische Signale umzusetzen und den Knochen auf diesem Weg an die veränderte Umwelt zu adaptieren (Aarden et al., 1994; Weinstein, Jilka, Parfitt, & Manolagas, 1998). Diese osteogenen Signalkaskaden sind dabei miteinander verschaltet und mehrfach abgesichert und reagieren neben den mechanischen Einwirkungen auch auf biochemische Veränderungen (Jakob et al., 2010). Die Osteozyten sind hierbei das Herz eines funktionierenden Netzwerkes (Aarden et al., 1994; Aguirre et al., 2007). Dieser Anpassungsmechanismus ist unter anderem davon abhängig, dass die Knochenzellen über eine Sensibilität verfügen, die es ihnen erlaubt, diese Signale zu erkennen. Diese Fähigkeit wird unter dem Begriff Mechanosensitivität verstanden und führt dazu, dass der Knochen über ein breites Spektrum an unterschiedlichem Knochengewebe verfügt, welches je nach Bedarf an die Anforderungen der Umwelt angepasst werden kann. Durch ihr weites Netzwerk sind Osteozyten in der Lage, kontinuierlich die normalen Levels der Dehnung mit der aktuellen mechanischen Dehnung zu vergleichen und daraufhin Signale an Osteoklasten und Osteoblasten zu senden, die dann entsprechend für einen Knochenaufbau oder den Knochenabbau sorgen (Kousteni et al., 2001). Bei diesem komplexen Prozess fungieren die Osteozyten als Mechanosensoren. Ihre Lebensspanne wird stark von mechanischen Kräften beeinflusst. So erhöht das Fehlen mechanischer Stimuli die Prävalenz einer Osteozyten-Apoptose mit den Folgen Verlust von Knochenmasse und Knochenstärke (Kousteni et al., 2001; Tomkinson, Reeve, Shaw, & Noble, 1997; Weinstein et al.,

1998). Der bezogen auf Osteozyten antiapoptotische Effekt der mechanischen Stimulation wird neben dem Integrin-Signalweg auch über intakte Caveolae, die Kinaseaktivität der Src und der Adhäsionskinase, nachgeschaltete Phosphorylierung und eine nukleäre Translokation der ERKs vermittelt (Hamdy, 2009). Er findet über nicht-genomische Aktivität der Östrogenrezeptoren statt (siehe hierzu auch 1.2.3.2).

1.1.2.3 Osteoklast

Zu den Funktionen der Osteoklasten gehören die Demineralisierung des Knochens und der Abbau von untauglichem Gewebe. Daher kommt diesen Knochenzellen eine Schlüsselfunktion im Bereich der Kalziumfreisetzung und der Umbauvorgänge im Knochen zu (Benninghoff & Drenckhahn, 2008). Die Progenitorzellen der Osteoklasten sind Vorläuferzellen des monozytären Phagozytensystems. Sie gelangen über die Blutbahn oder aus dem Knochenmark in das Knochengewebe und können hier mit Osteoblasten in Verbindung treten (Benninghoff & Drenckhahn, 2008). Der Osteoklast ist ein terminal differenzierter besonderer Makrophage (Jakob et al., 2010). Die Verbindung zwischen Osteoblast und Osteoklast entsteht über Cadherin 6, ein Adhäsionsprotein. Durch den Zell-Zellkontakt bindet der membranständige Receptor activator of NF κ B Ligand (RANKL) der Osteoblasten an seinen auf osteoklastären Progenitorzellen exprimierten Rezeptor RANK. Dieser Schritt ist für die Osteoklasten essentiell, da die Progenitorzellen somit zu mehrkernigen Osteoklasten fusionieren und so ein Synzytium bilden können (Benninghoff & Drenckhahn, 2008). Weitere Faktoren der Osteoblasten, die bei der Differenzierung der Osteoklasten eine Rolle spielen, sind CSF-1, IL-1, -6 u. -11, TNF- α und Prostaglandin E2 (Benninghoff & Drenckhahn, 2008). Sie sind ein Bestandteil des großen Spektrums an Botenstoffen, welche Einfluss auf Osteoklasten haben. Hierzu gehören neben den bereits oben erwähnten Faktoren vor allem das RANK/RANKL/OPG System und hormonelle Einflüsse (Jakob et al., 2010). Nachdem der Osteoklast über zelluläre Adhäsionsmoleküle zu der organischen Matrix des Knochens Kontakt aufgenommen hat, bildet er dort eine Resorptionslücke, in welcher es daraufhin zu einer Verschiebung des pH-Wertes ins saure Milieu kommt. Durch das saure Umfeld können dann Proteasen sezerniert werden, die den Knochenabbau einleiten (Jakob et al., 2010). Die Funktion des Osteoklasten ist sehr stark mit der Funktion des Osteoblasten verknüpft. Während der Knochenresorption beispielsweise werden zeitgleich sowohl für die Osteoblasten wichtige Wachs-

Einleitung

tumsfaktoren aus der Knochenmatrix freigesetzt als auch Botenstoffe Richtung Osteoblast sezerniert, die diesen stimulieren (Pavalko et al., 2003; Q. Zhao, Shao, Chen, & Li, 2007). Zudem kommt es bei der Knochenresorption zu einer Freisetzung von Kalzium, welches ebenso Einfluss auf die Aktivität der Osteoblasten hat. Da Osteoblasten über Kalzium-Sensing-Rezeptoren verfügen, werden diese durch die Kalziumfreisetzung stimuliert, und somit wird die Knochenformation angeregt (Duncan & Turner, 1995; Hamdy, 2009). Dies führt dazu, dass beim aktiven Knochenabbau gleichzeitig auch die Regeneration des Knochens in die Wege geleitet wird.

Osteoklasten sind äußerst potente Zellen, die über komplexe Mechanismen am Auf- und Abbau des Knochengewebes beteiligt sind. Durch Fehlregulationen im Bereich der Mechanotransduktion, durch Immobilisation oder auch durch Hormonmangel kann es in diesem komplexen System zu einer Fehlregulation kommen, die letztendlich Ursache für die Entstehung einer Osteoporose sein kann (Jakob et al., 2010).

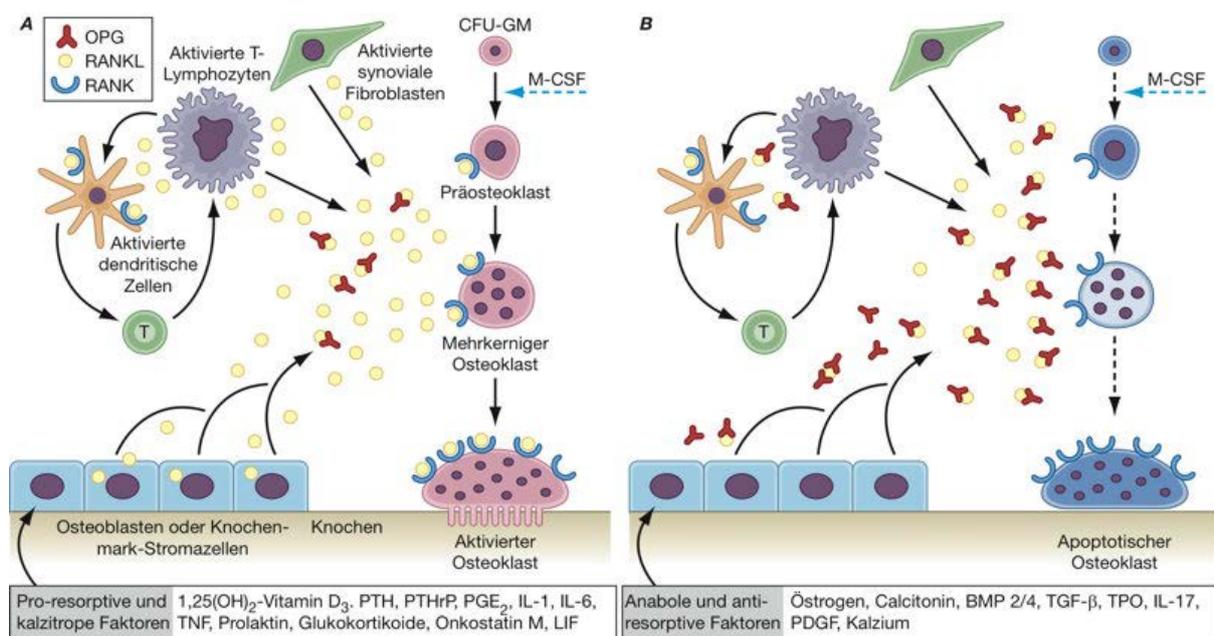


Abbildung 1: Darstellung der Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten (Boyle, Simonet, & Lacey, 2003). (Mit freundlicher Genehmigung der Springer Nature AG & Co. KGaA).

1.1.3 Mechanotransduktion und ihre Signalwege

Unter Mechanotransduktion versteht man einen auf zellulärer Ebene stattfindenden Transformationsmechanismus, der dafür sorgt, dass ein mechanischer Reiz zu einer Änderung der Genexpression und somit zu einer zellulären Antwort führt (Liedert, Kaspar, Blakytyn, Claes, & Ignatius, 2006). In diesen Ablauf der Mechanotransduktion sind Mechanorezeptoren wie Integrine, Cadherine, Kalziumkanäle und Signalwege involviert (Liedert et al., 2006). Zudem spielen Hormone, die extrazelluläre Matrix der Osteoblasten und mechanische Stimuli eine Rolle in Bezug auf die Regulation dieser Mechanismen. Konkret bedeutet dies, dass nach mechanischem Stress in Form von Dehnung, Kompression oder Flüssigkeits- und Scherstress am gesunden Knochen unterschiedliche Signalkaskaden in Aktion treten (Duncan & Turner, 1995). Dies geschieht über Rezeptoren, Kanäle, Adhäsionsmoleküle, das Zytoskelett und beispielsweise auch über das primäre Cilium als zellulärem Organell der Mechanotransduktion (Pavalko et al., 2003; Satir, Pedersen, & Christensen, 2010). Diese Faktoren sind in der Lage, mechanische Kräfte in biologische Signale umzuwandeln und letztendlich auf diesem Wege auf die Genregulation auf Zellkern-Ebene Einfluss zu nehmen und biologische Effekte zu generieren (Liedert et al., 2006).

Dies macht es dem Knochen möglich, sich den aktuellen Bedingungen spontan anzupassen. Hierbei weist der Knochen ein breites Spektrum an Möglichkeiten der Anpassung an sehr viele unterschiedliche Belastungssituationen auf, was zu einer guten Belastbarkeit des Knochens führt. Durch die Einwirkung von Kräften auf Zellen kommt es über eine Umsetzung in biochemische Signale zur Generation von biologischen Effekten (Herrmann et al., 2020). Während eine Steigerung der Kräfte mit Wiederholung der Reize eine anabole Wirkung aufweist, können Immobilisation und Simulation von Mikro-Gravitationen zum Verlust von Knochen und Muskel führen (Herrmann et al., 2020). Die bei der Osteoporose klinisch auffallende Fragilität der Knochen lässt sich auf molekularer Ebene als Dysadaptation an die mechanischen Anforderungen an den Knochen ausdrücken, als Unfähigkeit des Knochens, sich adäquat der neuen, veränderten Situation anzupassen (L. Seefried, R. Ebert, et al., 2010). Diese Anpassungsstörung kann unterschiedliche Auslöser als Ursache haben. Hierzu gehören zum einen ein ungenügender Kräfteintrag im Sinne einer mangelnden Herausforderung mit daraus resultierender ungenügender Signaltransduktion, Fehler in der Signaltransduktion oder Störungen der Mechanosensitivität der Knochenzellen. Daher erscheint es auch

Einleitung

logisch, dass der Verlust der Östrogene, einem Mechanosensitizer, solch ein Risikofaktor für die Entstehung und Manifestation einer Osteoporose ist, da dadurch nach der Menopause die Gefahr der ungenügenden Adaptation steigt (L. Seefried, R. Ebert, et al., 2010). Auch die Hauptregulatoren des Knochenstoffwechsels sind auf verschiedenen Ebenen mit der Mechanotransduktion verknüpft, so zum Beispiel das RANK/RANKL/OPG System, welches eng mit Signalwirkungen über Östrogene oder PTH verschaltet ist und damit indirekt mechanischen Einflüssen unterliegt (O'Brien, 2010).

Im Folgenden möchte ich aus den vielseitigen und komplexen Signalwegen, die in der Mechanotransduktion eine Rolle spielen, einige wesentliche herausgreifen und dabei besonders auf die Rolle der einzelnen Signaltransduktionsmoleküle eingehen, von denen viele in Adhärenskomplexen zu finden sind. Aktuell werden als Core- Signaltransduktionswege für die Knochenneubildung osteogene wnt-Signalkaskaden, die Signalkaskaden über den Parathormon-Rezeptor (PTH1R) und seine Liganden PTH und PTH1R sowie die Bone Morphogenetic Proteins (BMP), über die Rezeptoren der TGF β Familien wirkend, bezeichnet (Herrmann et al., 2020). Des Weiteren sind nukleäre Matrixproteine beispielsweise ein Weg, über den mechanische Signale integriert werden können. Diese sind Transkriptionsfaktoren, die auf Adhärensplaques lokalisiert sind und von dort in den Zellkern gelangen, an die DNA binden und essentiell an der Aktivierung von Promotoren mechanosensitiver Gene beteiligt sind (Liedert et al., 2006; Liedert et al., 2010). Diese bezeichnet man als DNA-responsive Elemente. Bei SP-1 und AP-1 handelt es sich um mechanoresponsive Transkriptionsfaktoren. AP-1 ist das gemeinsame Endprodukt von c-fos und c-jun. Durch die Aktivität extrazellulär regulierter Kinasen wird dieser vermehrt exprimiert (Liedert et al., 2006). SSRE (Shear Stress response element) ist eine Transkriptionsfaktorbindungsstelle, die in mehreren Genen wie beispielsweise c-fos und PDGF- β zu finden ist. SSRE ist nach Bindung in der Lage, eine mechanische Antwort zu aktivieren (Nomura & Takano-Yamamoto, 2000). Es konnten inzwischen weitere Elemente, die auf mechanische Belastung ansprechen, in Bezug auf die aktiven Transkriptionsfaktoren und die Antwort auf Dehnung, Kompression und Fluid Flow charakterisiert werden (Herrmann et al., 2020). Das Knorpelprotein COMP reagiert demzufolge auf Mechanotransduktion, des Weiteren konnte eine Region im Promotor des matrizellulären Proteins CCN1/CYR61 beschrieben werden, welches in der Frühphase der Regeneration ausgeschüttet wird (Herrmann et al., 2020). Auch zeigte sich, dass sich biochemische und mechanische

Einleitung

Einflüsse gegenseitig verstärken können, so etwa, dass eine Stimulation über den EGF- Rezeptor als Sensitizer für die mechanisch induzierte Bindung von AP-1 an seine responsiven Elemente wirken kann (Herrmann et al., 2020). Das Modell nach Pavalko (Pavalko et al., 2003) beschreibt Multiproteinkomplexe, auch Mechanosomen genannt, die aus Adhäsionsproteinen und DNA bindenden Proteinen bestehen, welche sich kontinuierlich zwischen Zellkern und den Adhäsionskomplexen bewegen und somit die Genexpression regulieren. Durch mechanische Stimulation kommt es zudem zu einer Hochregulation von Wachstumsfaktoren wie IGF-11 und IGF2, VEGF, TGF- β 1 und BMP2 und BMP4, die ihrerseits über ihre Kinase-Rezeptoren über autokrine und parakrine Mechanismen arbeiten und für die Aktivierung verschiedener Schritte im Bereich der Signaltransduktion verantwortlich sind. Prostaglandine und NO sind entscheidend an der zellulären Reaktion der mechanischen Stimuli beteiligt, da sie schnell vom mechanisch gestressten Knochen freigesetzt werden (Ajubi, Klein-Nulend, Alblas, Burger, & Nijweide, 1999a; Bacabac et al., 2004). In Osteozyten ist das Zytoskelett mit Ionenkanälen, der PKC und der PLA verbunden, was dazu führt, dass auf mechanische Reize eine Freisetzung von PGE2 erfolgt (Ajubi et al., 1999a; Ajubi, Klein-Nulend, Alblas, Burger, & Nijweide, 1999b). Ebenso wird die Expression der COX-2 als Isoenzym für die PGE2 Synthese in Osteoblasten hochreguliert. PGE2 sorgt nun nach Freisetzung zum einen dafür, dass es über eine Hochregulation der Anzahl an Gap Junctions und eine Erhöhung des Connexin 43 zu einer Vermittlung interzellulärer Signale zwischen den einzelnen Osteozyten kommt, zum anderen weist PGE2 einen regulatorischen Effekt auf die Expression von RANKL und somit auch auf die Osteoklastogenese auf (Cherian et al., 2005). NO wird ebenso wie PGE2 rasch nach mechanischem Stimulus von Osteozyten freigesetzt. Seine Expression ist stark von der Intensität des Flusses abhängig. Bei niedriger Flussgeschwindigkeit wird die NO Produktion der lokalen Osteozyten gebremst, was zur Apoptose dieser und zur Aktivierung von Osteoklasten führt mit der Folge, dass abgestorbener Osteozyt und Knochenmatrix vom Osteoklasten resorbiert werden (E. H. Burger, J. Klein-Nulend, & T. H. Smit, 2003; Elisabeth H. Burger, Jenneke Klein-Nulend, & Theo H. Smit, 2003). Dahingegen sorgt ein hoher Fluss für eine erhöhte NO Produktion, was sich präventiv auf die Osteozyten-Apoptose auswirkt (Mancini, Moradi-Bidhendi, Brandi, & MacIntyre, 1998). Integrine sind Transmembranproteine. Untereinheiten der in Osteoblasten vorkommenden Integrine werden durch Flüssigkeits-Scher-Stress aktiviert und fungieren als Mechanorezeptoren (Liedert et al., 2006). Der mechanische Reiz bei Bewegung

Einleitung

aktiviert des Weiteren spannungsabhängige Kalziumkanäle vom L- Typ, welche daraufhin für einen Kalziumeinstrom sorgen, der die ATP-Freisetzung stimuliert (Genetos, Geist, Liu, Donahue, & Duncan, 2005). Durch mechanische Stimulation werden die Plasmamembran, Zell-Zellkontakte und Zell-Matrixkontakte aktiviert, welche für die Rekrutierung von Cadherinen sorgen. Cadherine sind als transmembrane Glykoproteine der Adhärenskontakte an der Verbindung von Zytoskelettteilen benachbarter Zellen beteiligt und werden bei Erhöhung des mechanischen Reizes vermehrt exprimiert (Liedert et al., 2006). Über den Signalweg mit BMPs, Proteinen der TGF- β Superfamilie, werden die entscheidenden osteogenen Transkriptionsfaktoren hochreguliert (Lee, Kwon, Park, Wozney, & Ryoo, 2003). LRP5 ist ein transmembraner Lipoproteinrezeptor. Nach Mutation dieses Proteins kommt es zu einem erhöhten Ansprechen des Knochens auf mechanische Stimuli. Zudem sorgt dies für eine verstärkte Transkription von Osteoprotegerin und dadurch für eine verminderte Osteoklastogenese (Johnson, 2004). An GPCR, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, binden PGE₂, PGI₂ und Parathormon und sorgen über eine Aktivierung der Adenylatzyklase und somit über die Proteinkinase A für die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren und über die Phospholipase C für die indirekte Stimulation der Proteinkinase C (Hughes-Fulford, 2004). In Bezug auf die osteogenen wnt-Signalkaskaden und den Parathormon-Rezeptor und Liganden konnte in aktuellen Versuchen erneut ein Ansprechen auf mechanische Reize mit dem Ergebnis der verbesserten Knochenregeneration nachgewiesen werden. So zeigte sich in osteogenen Zellen mit einem Verlust der PTH1R-Expression eine verminderte Mechanosensitivität. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass sich der osteoanabole Effekt im Rahmen der Parathormon-Therapie in Kombination mit mechanischer Stimulation deutlich effektiver darstellte (Herrmann et al., 2020). NF κ B reguliert als Transkriptionsfaktor anti- und proinflammatorische Effekte in osteoblastähnlichem peridontalem Ligament (Agarwal et al., 2003). Bei IGF-1 handelt es sich um ein Zielgen für den Östrogenrezeptor. Bei starker Dehnung spielen auch die Effekte von IGF-1 im Gefolge der ER-modulierten Mechanotransduktion eine Rolle. Bei der mit Anorexie gekoppelten Form der Osteoporose spielt IGF-1 auch eine besondere Rolle. Hierbei kommt es durch den kombinierten Mangel an Östrogenen und IGF-1 als Ausdruck der gestörten Mechanotransduktion besonders leicht zum Entstehen von Stressfrakturen (Meczekalski, Podfigurna-Stopa, & Genazzani, 2010). Ebenso spielt der Östrogenrezeptor α (ER α) eine wichtige Rolle, zu den Einflüssen

Einleitung

und Wirkungen desselbigen folgt Näheres unter 1.2.2.1.1. Im Rahmen der Mechanismen der adaptiven Geweberegeneration in Muskel und Knochen folgt der initialen Mikroverletzung mit Freisetzung von Chemokinen über das Recruitment und die Proliferation von Vorläuferzellen die Phase der Gewebeneubildung, Modelling genannt, und abschließend die Phase der verfeinerten Adaptation an die vorherrschenden mechanischen Anforderungen unter den Gegebenheiten der Umgebung (Remodelling) (Herrmann et al., 2020). Hierbei konnten im Bereich des Recruitments und der Stimulation der ruhenden somatischen Stammzelle weitere Signalwege detektiert werden. So zeigte sich, dass über Adhäsionsmoleküle wie Integrine in Verbindung mit dem Zytoskelett die Zellspannung in der Stammzellumgebung registriert werden kann und bei erhöhter Spannung wichtige Signalwege aktiviert werden, welche dann Einfluss nehmen auf Aktivität und Differenzierung von Vorläuferzellen. Hierbei sind der YAP/TAZ-Signalweg sowie der HIPPO-Signalweg hervorzuheben, welche somit eine wichtige Rolle im Bereich der Mechanotransduktion in endothelialen Vorläuferzellen spielen (Herrmann et al., 2020).

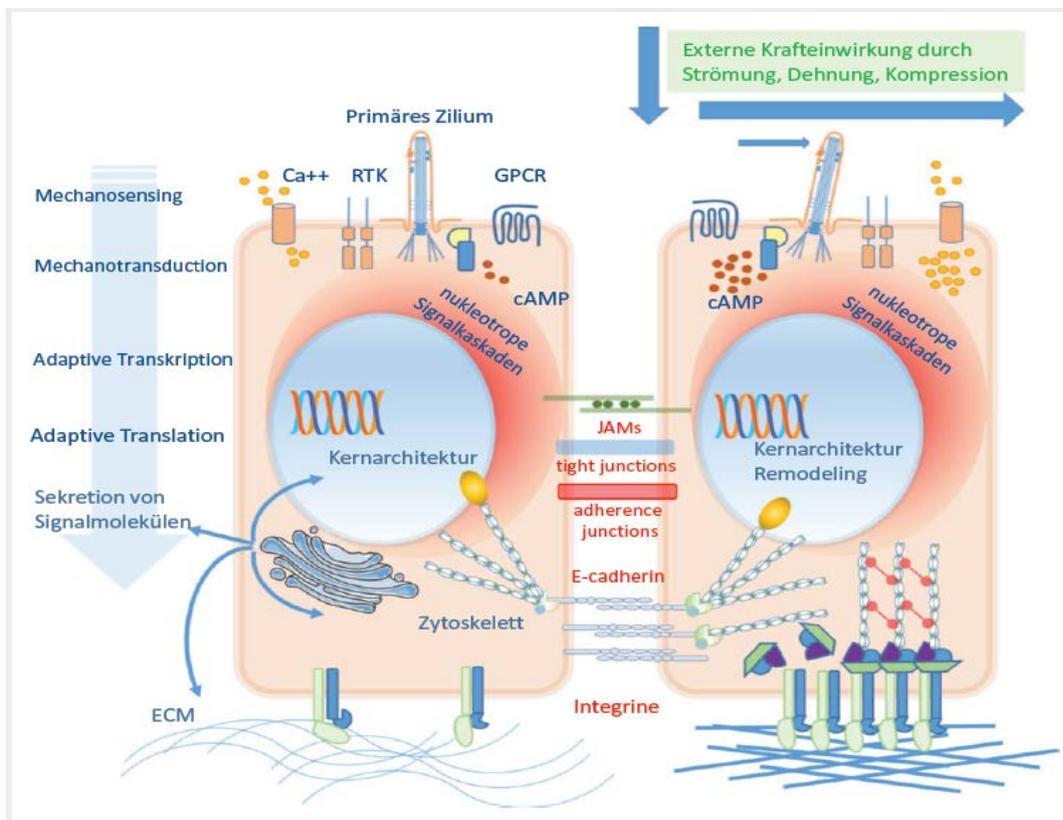


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Vorgänge in der Zelle bei Einwirkung mechanischer Kräfte (Herrmann et al., 2020). Gleiche Signalwege werden auch durch

Bewegung des primären Ciliums als singulärem Zellorgan moduliert. (Mit freundlicher Genehmigung von Biomolecules).

1.1.4 Knochenstoffwechsel

Auch Knochenaufbau und -abbau werden über unterschiedliche, im Folgenden zu erläuternde Signalwege gesteuert, in welche verschiedene Zytokine und Hormone als Überträgerstoffe eingeschaltet sind.

1.1.4.1 Signalwege im Knochenaufbau

Der Knochenaufbau wird über drei unterschiedliche, miteinander verschaltete Wege reguliert. Zum einen entsteht Knochenaufbau über eine intermittierende Stimulierung des Parathormon-Rezeptors, eine Erkenntnis, die man sich heute bereits in der Therapie der Osteoporose unter Anwendung von Parathormon-Präparaten zunutze macht. Ein anderer Weg geht über TGF- β -Rezeptoren, an welche sich osteogene BMPs binden. Auch BMPs werden bereits therapeutisch eingesetzt und stimulieren lokal die Knochenneubildung. Der dritte Signalweg ist ein komplexes Signalsystem, genannt Wnt/Frizzled-System, welches im Zusammenspiel mit LRP4 und 5 steht (Jakob et al., 2010).

Ein sehr wichtiges Protein im Bereich des Knochenaufbaus ist ein neu identifiziertes Protein, Sclerostin genannt. Es wird von Osteozyten sezerniert, greift an unterschiedlichen Stellen in die Knochenregeneration ein und hemmt diese durch Inhibition des wnt-Signalwegs. So kommt es bei einer verminderten bis ausbleibenden Sekretion des Sclerostin zu einer effektiven Regeneration des Knochens, während eine starke Sekretion dazu führt, dass die Knochenbildung ausbleibt und keine Regeneration mehr stattfindet. Man kann somit sagen, dass Sclerostin ein zentraler Effektor für die Regulation der Knochenmasse ist (Canalis, 2010; Kramer, Keller, Leupin, & Kneissel, 2010; Moester, Papapoulos, Lowik, & van Bezooijen, 2010).

1.1.4.2 Signalwege im Knochenabbau

Auch im Bereich des Knochenabbaus existiert ein zentrales Effektorsystem: das RANK/RANKL/OPG-System. Durch dieses System werden im Monozyten Signale entsendet und Signalkaskaden aktiviert, die entscheidend für die Entwicklung und Aktivierung von Osteoklasten verantwortlich sind. Bei OPG handelt es sich um einen löslichen Rezeptor der TNF-Familie, der das RANK/RANKL-System moduliert. OPG fängt

Einleitung

RANKL ab, verhindert so die Aktivierung von Osteoklasten und wirkt dem Knochenabbau entgegen. In dieses System wirken viele Signale mit ein, die durch Veränderungen des körperlichen, physiologischen Gleichgewichts beeinflusst werden können, wie es beispielsweise bei den bereits als Risikofaktor erwähnten Faktoren Immobilisation, Hormonverlust und auch bei Vorhandensein eines chronisch erhöhten Parathormons der Fall ist (O'Brien, 2010).

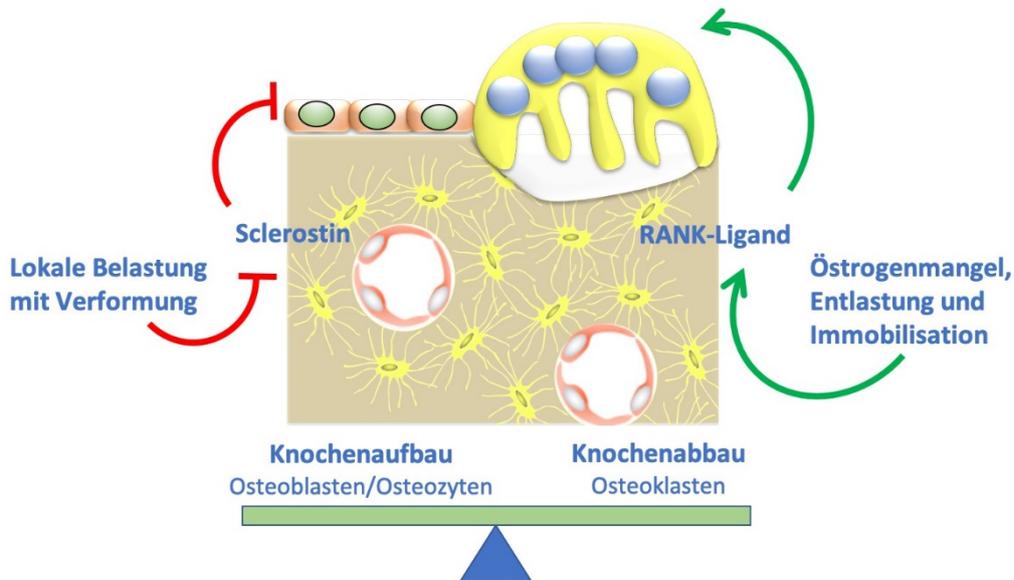


Abbildung 3: Regulation des Knochenaufbaus und –abbaus durch Schlüsselfaktoren und mechanische Belastung. Lokale Verformung des Knochens durch Strain hemmt die Sclerostin-Bildung und induziert sodie Knochenneubildung. Erhöhte RANKL-Bildung bei Östrogenmangel und Entlastung fördert Knochenabbau. (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. F. Jakob).

1.2 Die Bedeutung der Sexualhormone für den Knochenstoffwechsel

1.2.1 Östrogene und Androgene

Wie bereits unter 1.1 beschrieben gilt als wissenschaftlich gesichert, dass Sexualhormone wie Östradiol und Dihydrotestosteron (DHT) bei der Entwicklung, dem Wachstum und der Regeneration des Knochens eine bedeutende Rolle spielen. Aus dem Vorläufersteroid Testosteron wird über Aromatase Östradiol gebildet, verantwortlich für die Regulation von Anzahl und Aktivität der Osteoklasten und die Unterstützung

Einleitung

der Knochenformation (Jakob et al., 2010). Aromatase wird in osteoblastären und monozytären Zellen exprimiert. Über die 5α -Reduktase, welche bereits in mesenchymalen Stammzellen und in mesenchymalen Osteoblastenvorläufern vorkommt, wird die Bildung von 5α -Dihydrotestosteron initiiert. Östradiol ist das wichtigste weibliche Sexualhormon aus der Klasse der Steroidhormone. Bildungsort sind der Follikel und der Gelbkörper der Eierstöcke und die Nebenniere, wo ein kleiner Anteil produziert wird. Weitere Bildungsorte sind die Plazenta in der Schwangerschaft, der männliche Hoden und das Fettgewebe, in dem ein bestimmter Teil des Testosterons wie sonst auch durch die Aromatase in Östrogene umgewandelt wird. Therapeutisch werden meist künstliche Östrogene in Form von Estern eingesetzt, da sie auf diese Art und Weise langsamer abgebaut werden und länger wirksam sind (Pfleiderer A.).

Dihydrotestosteron (DHT) ist der biologisch aktivste Metabolit des Hormons Testosteron. Es gehört ebenso wie Östradiol zur Klasse der Steroidhormone und zählt zu den Androgenen. Es ist in vielen Organen das eigentlich wirksame Androgen. Es wird erst in den Zielzellen über die 5α -Reduktase aus Testosteron synthetisiert. Dihydrotestosteron ist für die äußere Virilisierung, für das Wachstum und die Differenzierung der Prostata verantwortlich und hat auch Einfluss auf den Knochenstoffwechsel.

Während bei der Frau die systematische Versorgung mit aktiven Sexualhormonen in der reproduktiven Phase durch deren Produktion in den Gonaden bestimmt wird, ist die Versorgung postmenopausal abhängig von der Aktivität der Zona reticularis der Nebennierenrinde (Jakob et al., 2010). Bei Adipositas können Sexualhormone zusätzlich durch eine beträchtliche Menge an Aromatase in den Fettzellen peripher produziert werden (Jakob et al., 2010). Dieser Weg kann zum Beispiel für die Aufrechterhaltung der Östrogenproduktion aus adrenalen Androgenen nach der Menopause sorgen. Fest steht, dass in beiden Phasen eine lokale Versorgung mit Sexualhormonen eine nicht zu vernachlässigende Rolle spielt.

Die lokale Produktion von Sexualhormonen ist dadurch möglich, dass periphere Zellen in der Lage sind, aus Vorläufersteroiden hormonell aktive Sexualhormone zu bilden, ebenso wie sie auch aus aktiven Hormonen die ersten Schritte des Abbaus einleiten. Ursache dafür ist die Tatsache, dass jene Zellen die entsprechenden Enzyme aus der P450-Familie und entsprechende Steroiddehydrogenasen exprimieren, welche ein adäquates, lokales Milieu für die Vorläufersubstanzen schaffen (Jakob et al., 2010). Bei Versuchstieren, die Aromatase osteoblastenspezifisch überexprimieren, ist die

Knochenmasse deutlich erhöht. Dies zeigt, dass die lokale Aromatisierung von Testosteron zu Östradiol für den Knochenmetabolismus und die Knochenmasse eine große Bedeutung hat (Sjogren et al., 2009). Diese Aussage wird durch die Erkenntnis über Krankheiten mit einem Aromatasemangel gestützt, bei denen eine signifikant verminderte Knochendichte bekannt ist. Dieses Wissen ist natürlich im Besonderen für die therapeutischen Optionen der Osteoporose interessant. Die Therapie mit Steroidhormonvorläufern wie z.B. Dehydroepiandrosteron (DHEA), die lokal gewebespezifisch aktiviert werden, ist für den Knochen möglicherweise bedeutsam. DHEA kann dadurch in Knochen zu hormonell aktiven Steroiden umgesetzt werden und weist im Gegensatz zu Östradiol keine direkt stimulierende Wirkung auf Uterus und Endometrium auf, ein Effekt, der sehr wünschenswert ist (Wang, Wang, Wang, & Li, 2009). Molekulare Grundlage der Wirkung der Sexualsteroiden sind spezifische Rezeptoren im Knochengewebe und in den Knochenstoffwechsel beeinflussenden Organen, die dafür sorgen, dass der Knochenstoffwechsel auf Gen-Ebene moduliert werden kann. Hierbei spielen im Wesentlichen drei Rezeptoren eine entscheidende Rolle: Der Östrogenrezeptor, der Androgenrezeptor und ein G-Protein gekoppelter Rezeptor 30, GPER genannt, der zellmembranassoziiert ist.

1.2.2 Wirkung von Östrogenen auf den Knochenstoffwechsel

Die Östrogenwirkung findet über Bindung an die Östrogenrezeptoren ER α und ER β in bestimmten Zielgeweben statt. Östrogene dienen als Schlüsselregulatoren für Wachstum und Differenzierung vieler Gewebearten wie Brustdrüse, Reproduktionstrakt, ZNS und Skelettsystem. Wie bereits unter 2.1 beschrieben gilt als wissenschaftlich gesichert, dass Östrogene auch an der Entwicklung, dem Wachstum und der Regeneration des Knochens beteiligt sind. Östrogene vermitteln über verschiedene Signalwege ihre Wirkung auf den Knochenstoffwechsel. Dabei muss bedacht werden, dass die direkte Wirkung von Sexualhormonen über Rezeptorbindung schwer von der indirekten Wirkung auf die Knochenhomöostase, die aufgrund der Reaktion anderer Gewebe auf Östrogene vermittelt wird, getrennt werden kann (Jakob et al., 2010). Die klassischen Zielgene für die Östrogenrezeptoren in osteoblastären Zellen sind Gene mit Wirkung auf die Osteoklasten (Hofbauer, Kuhne, & Viereck, 2004). Östrogene haben auf den Knochen einen, bezogen auf die Knochenformation und -regeneration, positiven Effekt, auch wenn sie nicht per se anabol wirken (Mochizuki, Yoshida, Yamanaka, Matsuo, & Maruo, 2005; Monroe et al., 2003; Venken, Callewaert, Boonen, &

Einleitung

Vanderschueren, 2008). Dieser entsteht durch seine unterschiedliche Wirkung auf Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten.

Östrogene üben ihre knochenbildende Wirkung auf zellulärer Ebene zum Teil auf Osteoblasten aus. Östrogene spielen zum einen eine große Rolle, wenn es darum geht, im Knochenmark mesenchymale Vorläuferzellen in Richtung Osteoblasten zu differenzieren, zum anderen für die endgültige Ausdifferenzierung von Vorläuferzellen bis zu funktionstüchtigen Osteoblasten (Dang, van Bezooijen, Karperien, Papapoulos, & Lowik, 2002). Östrogene verhindern die Apoptose der Osteoblasten und hemmen zudem die Aktivierung der Knochenumgestaltung und die Initiierung von neuen Funktionseinheiten, den sogenannten Basic Multicellular Units (BMU) (Lufkin et al., 1992). Die Wirkung von Östrogen auf Osteozyten spielt bei der postmenopausalen Osteoporose eine große Rolle. Im Osteozyten findet die Messung und Weiterleitung von Knochenbelastung und die Weiterleitung dieser Information zur Initiierung von lokalen Reparaturmechanismen, Knochenbildung und Knochenabbau statt (Mödder, 2010). Zudem fördern Östrogene die Mechanosensitivität der Osteozyten. Dies ist ein entscheidender Grund für den Knochenmasseverlust bei raschem Hormonverlust: durch den Östrogenmangel kommt es über eine Abnahme von Östrogenrezeptoren und über die verminderte Mechanosensitivität der Osteozyten zu einer verminderten Adaptation des Knochens an die mechanischen Anforderungen. Die Knochenneubildung bleibt aus. Daher kommt es postmenopausal zu einer erhöhten Knochenfragilität (Lothar Seefried et al., 2010). Zudem führt der Verlust der Östrogen-Produktion in der Menopause zu einem Anstieg von IL-1, IL-6, IL-7 und TNF- α , welche für eine gesteigerte Bildung von Osteoklasten sorgen (Mödder, 2010). Durch Hemmung von TNF- α und IL-1 kann dieser Knochenverlust vermindert werden (Kimble et al., 1995; Kitazawa, Kimble, Vannice, Kung, & Pacifici, 1994). Ein anderer Weg über den dem Knochenabbau entgegengesteuert wird, ist die Wirkung der Östrogene auf Osteoklasten. Östrogene sorgen an Osteoklasten für eine verminderte Synthese und einen verstärkten Abbau derselben (Parikka et al., 2001; Srivastava et al., 2001). Östrogene hemmen die Differenzierung und fördern die Apoptose von Osteoklasten und reduzieren somit über Modulation des RANKL die Resorption von Knochen. Die Hemmung der Osteoklasten-Differenzierung geschieht über eine Verringerung von Zytokinen, die die Synthese und Aktivität der Osteoklasten unterstützen. Die Förderung der Apoptose findet über Modulation des Fas-Liganden statt. Der Fas-Ligand in Osteoklasten induziert klassischerweise die Apoptose dieser Zellen. Durch Östradiol wird die Anzahl an Osteoklasten,

die FasL-positiv sind, erhöht, und somit auch die Apoptoserate dieser Zellen; es kommt zu einer Osteoklasten-Vernichtung (Jakob et al., 2010). Über diesen Weg können Östrogene für eine Verminderung der Osteoklasten sorgen. Alternativ kann die Apoptoserate der Osteoklasten über einen Östrogenrezeptor-Agonisten gesteigert werden. Dieser Agonist, der nur den nicht-genomischen Signalweg aktiviert, induziert an Osteoklasten Apoptose. Hierfür ist die Bindung der Rezeptoren an die DNA nicht erforderlich. Zudem kann über die Stimulation der Osteoprotegerin-Synthese die Produktion der Osteoklasten gehemmt werden (Jakob et al., 2010).

Tritt ein Verlust an Sexualhormonen auf, kommt es über unterschiedliche Mechanismen zu einem erhöhten Knochenabbau mit starkem Knochenverlust. Dies geschieht einerseits, da über den Östrogenrezeptor und den Androgenrezeptor der OPG/RANKL-Quotient beeinflusst wird, und andererseits über eine Regulation der Produktion des Apoptose-induzierten Fas-Liganden in Osteoklasten. Dieser Schritt findet nur über den Östrogenrezeptor statt. Zudem kommt es zu reaktiven Veränderungen in der Produktion hypophysär regulierender Hormone, hierbei vor allem FSH, Activin und Inhibin (Nicks, Perrien, Akel, Suva, & Gaddy, 2009). Diese Hormone haben Effekte auf den Knochenmetabolismus und mesenchymale Vorläuferzellen. Auch kommt es über eine vermehrte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 oder TNF- α zur Stimulation der Osteoklastogenese (Pacifici, 2008).

1.2.2.1 Östrogenrezeptoren

Wie bereits erwähnt spielen Östrogene eine bedeutende Rolle im Bereich des Aufbaus, der Aufrechterhaltung und der Umgestaltung des Knochens. Hierbei können Östrogene auf verschiedenen Wegen ihre Wirkung vermitteln. Dies geschieht über zwei unterschiedliche Rezeptoren, den Östrogenrezeptor α (ER α) und den Östrogenrezeptor β (ER β), welche beide zu der Familie der Steroidrezeptoren gehören. Diese wirken als Dimere, um die Transkriptionsaktivität zu regulieren (C. Zhao, Dahlman-Wright, & Gustafsson, 2008). Sie kommen in Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten vor und stehen unter dem Einfluss von Rezeptoraktivatoren und Rezeptorrepressoren. ER α und ER β benutzen verschiedene Signalwege, um bestimmte Gene zu regulieren. Sie verfügen über unterschiedliche biologische Funktionen, erkennbar an jeweils unterschiedlichen Expressionmustern und Phänotypen an Knock-out-Mäusen, und haben je eine eigene und teilweise auch überlappende Rolle in Bezug auf den Östrogensignalweg (Dahlman-Wright et al., 2006; Harris, 2007). So verfügen sie auch

Einleitung

je nach Zelltyp, Ligand und Promotor über unterschiedliche Transkriptionsaktivitäten. ER α und ER β unterscheiden sich schon in ihrer verschiedenen Expression in den einzelnen Geweben. So konnte man feststellen, dass im kortikalen Knochen eher ER α vorkommt, während im trabekulären Knochen neben wenig ER α eher ER β vorherrscht. Man vermutet, dass ER β eher generell und ER α eher in spezifischen Geweben mit hauptsächlich reproduktiver Wirkung vorkommt (Bord, Horner, Beavan, & Compston, 2001).

Die Östrogenrezeptoren bestehen aus 3 unabhängigen, jedoch untereinander interagierenden Domänen, die A/B-Domäne, die C-Domäne und die D/E/F-Domäne (Mödder, 2010): Die NH₂-terminale Domäne oder A/B-Domäne besitzt eine ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion (AF-1), die an der Protein-Protein Interaktion und der transkriptionalen Aktivierung von Zielgenen beteiligt ist (Tora et al., 1989). Dies ist die Region, die die höchste Variabilität besitzt. So stimmen bei ER α und ER β nur weniger als 20% der Aminosäuren im Bereich dieser Region überein (C. Zhao et al., 2008). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Region dafür verantwortlich ist, dass die beiden Rezeptoren teilweise sehr unterschiedliche Funktionen besitzen. Daneben existiert eine DNA bindende Domäne (DBD) oder C-Domäne, die eine Rolle bei der DNA-Bindung und bei der Rezeptor-Dimerisierung spielt. Diese Region ist bei ER α und β zu 95% identisch und weist damit die höchste Übereinstimmung an AS der verschiedenen Regionen auf (McInerney, Weis, Sun, Mosselman, & Katzenellenbogen, 1998). Der E-Domäne wird die Bedeutung als ligandenbindende Domäne (LBD) zugeordnet. Hier gibt es eine AS-Übereinstimmung von 55%, und es existiert eine hormonabhängige Aktivierungsfunktion, AF-2 genannt (Tora et al., 1989). Zudem gibt es eine D-Domäne, die als flexibles Gelenk zwischen DBD und LBD fungiert. Das Zusammenspiel zwischen D-, E- und F-Domäne sorgt für die Vermittlung von Ligandenbindung, Rezeptordimerisierung, Zellkerntranslokation und Transkription von Zielgenen. Volle Transkriptionsaktivität durch ERs wird über Synergismen zwischen den zwei Aktivierungsdomänen, AF-1 am N-Terminus und AF-2 in der LBD erreicht. Während ER α und ER β beide eine wirkungsvolle AF-2 Funktion besitzen, scheint die AF-1 Funktion bei ER β schwächer auszufallen. Daher scheint die Transkriptionsaktivität bei ER β stärker von der AF-2-Funktion abzuhängen. In ihrer Funktion sind sich die beiden Rezeptoren teilweise sehr ähnlich, teilweise unterscheiden sie sich funktionell jedoch auch (siehe Abb. 5) (C. Zhao et al., 2008).

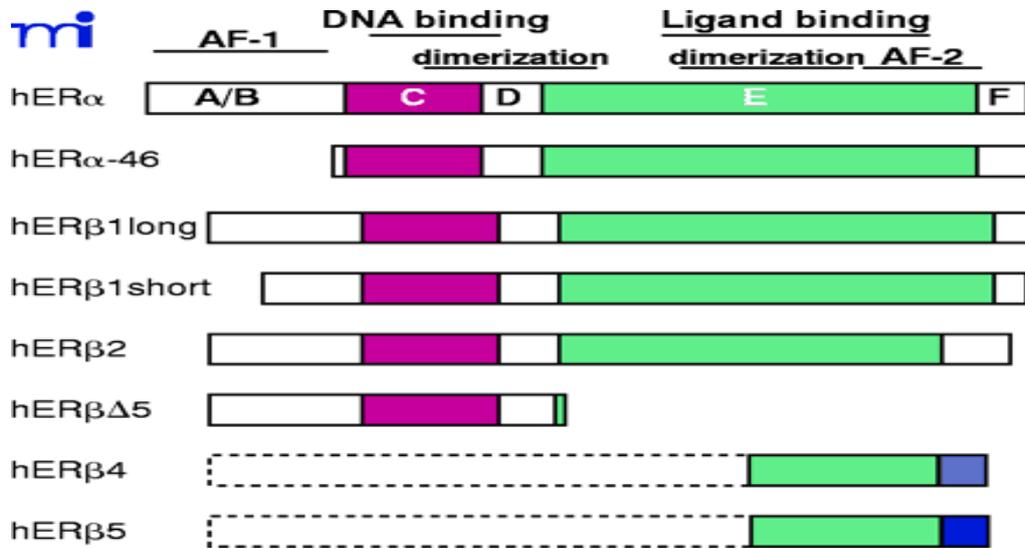


Abbildung 4: Vergleich der Protein-Struktur des humanen ER α - & β -Proteins (Matthews & Gustafsson, 2003). (Mit freundlicher Genehmigung der ASPET).

Interessant sind diese Erkenntnisse auch in Bezug auf die pharmakologische Therapie, wenn es darum geht, unliebsame Nebenwirkungen einzudämmen. Man kann theoretisch ER α - oder β -spezifische Liganden entwickeln, beispielsweise ER β -spezifische Östrogen-Agonisten, die als Zielgewebe den Urogenitaltrakt, das kardiovaskuläre System und den Knochen haben, ohne dass Effekte bezogen auf Mamma und Uterus auftreten (Wang et al., 2009). Dies wäre in der Behandlung der postmenopausalen Osteoporose von großem Vorteil.

Das Heterodimer aus ER α und ER β scheint weniger sensibel gegenüber Östrogen als das ER α Homodimer (Mödder, 2010). Aufgrund der Annahme, dass im kortikalen Knochen eher ER α und im trabekulären Knochen eher ER β vorkommt, nimmt man an, dass Zellen, die im trabekulären Knochen mehr ER β haben als im kortikalen Knochen, eine verminderte Sensibilität bezüglich Östrogenen aufweisen. Diese Vermutung wird dadurch bestärkt, dass nach Ovariectomie die vierfache Menge an Östradiol notwendig ist um einen trabekulären Knochenverlust zu verhindern, im Gegensatz zu der Menge, die zur Vermeidung eines kortikalen Knochenverlusts nötig ist (Sims et al., 2002). Für die Kontinuität der Aufrechterhaltung der physiologischen Knochendichte ist eine Mischung aus einem Gleichgewicht an Rezeptor, Koaktivator- und Korepressor-Proteinen nötig, und verbunden damit eine genaue Regulierung der verschiedenen

Östrogensignalwege (Mödder, 2010). Zu der Koaktivatoren-Familie gehören unter anderem die Steroid Receptor Coactivator (SRC), deren Mitglieder ein rezeptor- und zelltypspezifisches Bindungsverhalten aufweisen und welche die Aufrechterhaltung des Knochens fördern (J. Xu & O'Malley, 2002). Zudem haben sie Einfluss auf die Osteoblastogenese und Adipogenese von mesenchymalen Stammzellen im Knochenmark.

1.2.2.1.1 Östrogenrezeptor α

Der ER α , bereits 1958 entdeckt und auf Chromosom 6 gelegen, wird überwiegend in Uterus, Zervix und Vagina, Ovar, Mamma, Hypophyse, Testes, Leber, Milz, Herz und Skelettmuskulatur exprimiert (Gustafsson, 1999). ER α ist ein wichtiger Kandidat für die genetische Regulation der Knochenmasse und daher in Bezug auf die Osteoporose eines der am besten untersuchten Kandidatengene. In verschiedenen Studien wurden Polymorphismen im Bereich des Intron 1 festgestellt, die mit der Entstehung von Osteoporose assoziiert wurden.

1.2.2.1.2 Östrogenrezeptor β

Die genetische Information zum ER β , welcher 1995 entdeckt wurde, liegt auf Chromosom 14. Es handelt sich hierbei um ein Protein aus 530 AS, welches durch 8 Exons kodiert wird (C. Zhao et al., 2008). Wie bereits beschrieben spielt der ER β in vielen Gewebearten eine bedeutende Rolle. Er kommt im ZNS, dem kardiovaskulären System, dem Immunsystem, dem Urogenitaltrakt, dem Gastrointestinaltrakt, in den Nieren und in der Lunge vor. In Mamma und Uterus ist ER β zwar auch vorhanden, jedoch in geringerer Konzentration als ER α , welcher dort die weitaus größere Dominanz hat (Hirata, Shoda, Kato, & Hoshi, 2001).

Uns sind heutzutage zwei Isoformen der mRNA von ER β bekannt, die unterschiedliche untranslatierte 5' Regionen aufweisen (C. Zhao et al., 2008). Sie entstehen durch alternatives Splicing zweier Exons, Exon 0K und Exon 0N. Daraus kann man schließen, dass die Transkription des humanen ER β -Gens von mindestens zwei verschiedenen Promotoren stammt, den Promotoren 0N und 0K. Expression der beiden Transkripte, die von den Promotoren 0K und 0N ihren Ursprung haben, sind in mehreren menschlichen Geweben wie Leber, ejakulierten Spermatozoen, Endometrium und Myometrium entdeckt worden. Zudem wurden vollständige ER β -cDNA-Sequenzen gefunden,

Einleitung

die weder den ON noch den OK Promotor aufweisen, was auf die Existenz noch weiterer Promotoren hindeutet (Ogawa et al., 1998). Als Ergebnis alternativen Splicings der letzten kodierenden Exons, also der Exons 8 und 9, der Deletion eines oder mehrerer kodierender Exons und des alternativen Nutzens untranslatierter Exons in der 5' Region sind fünf vollständige Transkripte entstanden, genannt ER β 1-5 (Lewandowski, Kalita, & Kaczmarek, 2002).

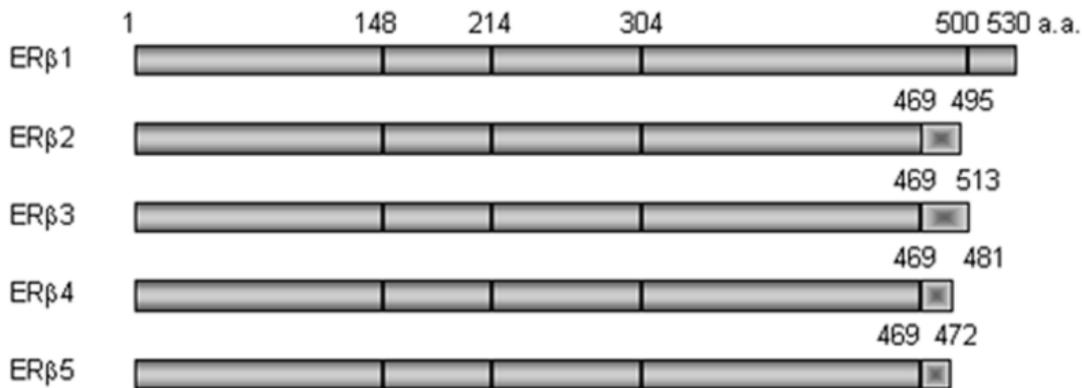


Abbildung 5: ER β Isoformen ER β 1-5 (C. Zhao et al., 2008). (Mit freundlicher Genehmigung des Signaling Pathways Project).

ER β 1 ist von 8 Exons translatiert und kodiert 530 AS. ER β 2 bis 5 sind mit Exon 1-7 identisch, was die Sequenz betrifft, weisen jedoch bei Exon 8 eine Individualität auf (Moore et al., 1998). ER β 4 und 5 können mit dem ER β ein Heterodimer bilden und die Transaktivierung ligandenabhängig steigern. Näher eingehen möchte ich auf die Isoform ER β 2. Dieser Rezeptor kodiert bei einem Molekulargewicht von 55,5 kDa ein Protein mit 495 AS. Er hat einen einzigartigen C-Terminus, der durch alternatives Splicing bedingt ist. Die Aminosäuren, die mit Exon 8 korrespondieren, sind durch 26 einzelne AS ersetzt (Ogawa et al., 1998). Daher entbehrt ER β 2 die AF-2 Region und hat eine unentdeckte Affinität zu Östradiol und anderen getesteten Liganden. Es wurde gezeigt, dass ER β 2 über ein ERE Reporter-Gen die liganden-induzierte ER α Transkriptionsaktivität hemmt (Ogawa et al., 1998). Auch für einen antagonistischen Effekt des ER β 2 an ER α vermittelter Transaktivierung gibt es möglicherweise einen molekularen Mechanismus. Durch Formation von ER β 2/ER α Heterodimeren induziert er den proteasomenabhängigen Abbau von ER α (C. Zhao et al., 2007). Dies ist ein Mechanismus,

Einleitung

bei dem die Expression von ER β 2 die Fortleitung von ER β zu den Östrogen-responsiven Promotoren hemmt. Daraus resultiert eine Unterdrückung der ER α regulierten Gene (C. Zhao et al., 2007).

ER β spielt im Gewebe der Ovarien, des Uterus, der Brustdrüse, des Gehirns, des Immunsystems und der ventralen Prostata eine Rolle und hat daher in diesen Bereichen auch seine Wirkungsorte (Harris, 2007). Man vermutet, dass ER β alleine nur eine kleine oder keine direkte Rolle in Bezug auf den Knochenumbau spielt. Man nimmt vielmehr an, dass seine Hauptaufgabe in der Regulierung der ER α Aktivität liegt und dadurch dem Vermitteln von Effekten von ER α dient (Mödder, 2010). Eine besondere Bedeutung kommt dem ER β in Bezug auf Karzinogenese und Zellproliferation zu. Hier scheint er protektiv zu wirken (Bardin, Boulle, Lazennec, Vignon, & Pujol, 2004; Skliris et al., 2003). Dies geschieht beispielsweise über den TGF- β -Signalweg. TGF- β ist normalerweise mit der Unterdrückung der Brustkrebszellproliferation assoziiert. Da ER β mehrere Komponenten des TGF- β - Signalweges reguliert, nimmt man an, dass auch ER β eine entscheidende, protektive Rolle übernimmt (Lin et al., 2007). Ein anderer Ansatz, der die kanzeroprotektive Wirkung der ER β -spezifischen Signaltransduktion an Östrogenen erklären kann, findet im Bereich der Promotor-Regionen statt (Rody et al., 2005; C. Zhao et al., 2003). Das Expressionsniveau von ER β wird über die Chromatin-Kondensation von Promotor-Regionen reguliert. Dies geschieht über Hypermethylierung von CpG-Inseln im ER β Promotor (Matthews & Gustafsson, 2003). Diese Hypermethylierung ist wiederum assoziiert mit einem markanten Abfall der ER β mRNA-Expression bei Brustkrebs, Prostatakrebs und Krebszelllinien. Die Hemmung dieser DNA- Methyltransferase reaktiviert die ER β -Expression in diesen Zelllinien. Es ist berichtet worden, dass die Hypermethylierung des Gen-Promotors an CpG-Inseln eine große Rolle bei der Entstehung und beim Voranschreiten verschiedener Krebsarten spielt. Daher ist die Identifizierung hypermethylierter Gene in Tumoren ein wichtiger Schritt in Bezug auf das Erreichen einer tumorbezogenen Genaktivierung. Die Erkenntnis über die Stilllegung des ER β -Gens über Hypermethylierung von Promotoren in Tumoren lässt vermuten, dass das ER β -Gen eine wichtige Rolle im Bereich des Tumorprogresses spielt und als prognostischer molekularer Marker verwendet werden könnte (Chang, Frasor, Komm, & Katzenellenbogen, 2006; Lazennec, Bresson, Lucas, Chauveau, & Vignon, 2001). Zudem ist ER β in die Kontrolle von antioxidantienregulierten Genen eingebunden (Chang et al., 2006; Montano, Jaiswal, &

Einleitung

Katzenellenbogen, 1998). Von deren Produkten ist bekannt, dass sie die Konzentration von freien Radikalen kontrollieren und für die Reaktivierung von Sauerstoff in den Zellen sorgen (Gustafsson, 1999).

Auch in Bezug auf den Reproduktionstrakt spielt ER β eine entscheidende Rolle. So tritt bei weiblichen Mäusen, denen der ER β fehlt, eine verminderte Fertilität auf (Gustafsson, 1999). Das Verhältnis von ER α zu ER β im Ovar beträgt 1:9. Daher ist ER β für normal funktionierende Ovarien unverzichtbar (Gustafsson, 1999). Während in der ersten Zyklushälfte ER β dominiert, nimmt es in der zweiten Hälfte stark ab (Byers, Kuiper, Gustafsson, & Park-Sarge, 1997). Durch Mangel an ER β kommt es zu follikulärem Stillstand und Anovulation bei erhöhtem Stromawachstum. Aufgrund der Ergebnisse unterschiedlicher Versuche nimmt man an, dass ER β in den Ovarien für die Stimulation der frühen Follikulogenese, die Abnahme der Follikulätratresie, die Induktion der ovariellen Genexpression, die Stimulation des späten, follikulären Wachstums und den Anstieg der Anzahl ovulierter Eizellen unverzichtbar ist. ER α hatte indes keinen oder nur einen schwachen Effekt. Daraus kann man schließen, dass die direkten Östrogeneffekte an der ovariellen Follikularentwicklung über den ER β vermittelt werden. Dies legt nahe, dass ER β -Agonisten als neues Therapeutikum für die Verbesserung der ovariellen Funktion bei subfertilen oder infertilen Frauen von Bedeutung sein könnten (C. Zhao et al., 2008). Im Urogenitaltrakt scheint ER β wichtig für die Kontrolle des Epithelwachstums. Dies passt zu der Hypothese, dass ER β protektiv gegen Hyperproliferation und Karzinogenese wirkt (Gustafsson, 1999). Man konnte nachweisen, dass es durch ER β zur Rückbildung der ventralen Prostata kommt (Norman et al., 2006). Somit scheint ER β ein wertvoller Kandidat für neue pharmakologische Annäherungen zu sein, um dysreguliertem Prostata-Wachstum entgegenzuwirken (C. Zhao et al., 2008).

Ergebnisse aus Versuchen an Mäusen lassen zudem vermuten, dass ER β vaskuloprotektiv und effektiv gegen Entzündungsschmerzen wirkt (Leventhal et al., 2006).

Interessant ist die Hypothese von Saxon (Saxon & Turner, 2005), welche suggeriert, dass ER β nicht nur keinen Effekt auf die Knochenbildung per Mechanotransduktion hat, sondern dass das Vorhandensein des ER β die über ER α regulierte Genexpression im Knochen sogar hemmt. Dies wurde anhand eines Versuchs im Mausmodell bestätigt, bei dem sich zeigte, dass Mäuse, die den ER β entbehren, eine erhöhte Genexpression im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen mit ER β aufweisen, nachdem sie mit

Östrogenen stimuliert worden sind (Saxon, Robling, Castillo, Mohan, & Turner, 2007). Hierbei zeigte sich, dass es zwar geringe Unterschiede in Bezug auf den knöchernen Phänotyp gab, jedoch die kortikale Knochenmasse reduziert war und die periostale Knochenneubildung bei den weiblichen, den ER β entbehrenden Mäusen dreimal höher war als bei den Wildtyp-Mäusen. Währenddessen gab es diese Unterschiede beim männlichen Versuchsaufbau nicht. Auch zeigten ähnliche Versuche mit ER α eine Steigerung des Knochenaufbaus bei vorhandenem ER α . Daraufhin wurde postuliert, dass die Signalübertragung über den ER α zu einer erhöhten Mechanosensitivität des Knochens führt, während der Signalweg über den ER β die Knochenbildung nach Dehnung hemmt und somit als negativer Modulator der periostalen Reaktion auf mechanische Dehnung antimechanostatisch wirkt (Saxon et al., 2007). Auch Gustafsson hatte vermutet, dass zwischen ER α und ER β sowohl eine kooperative als auch eine kompetitive Interaktion besteht (Matthews & Gustafsson, 2003).

1.2.3 Signalwege von ER α und ER β

ER α und ER β agieren über zwei sehr unterschiedliche Signalwege, welche im Folgenden näher beleuchtet werden sollen.

1.2.3.1 Genomischer Signalweg

Beim genomischen Signalweg wird zwischen einem klassischen und einem nicht-klassischen Signalweg unterschieden. Beim klassischen Signalweg entsteht eine direkte Verbindung zur DNA. Vor Bindung des Östrogens an den Rezeptor befindet sich dieser in Verbindung mit einem Multiproteinkomplex im Zytosol (Mödder, 2010). Binden Östrogene nun an den Östrogenrezeptor, findet am Rezeptor eine Konformationsänderung statt, die dazu führt, dass der Rezeptor ligandenaktiviert in den Zellkern verschoben wird (Beato, Herrlich, & Schutz, 1995). Der Komplex aus Rezeptor und Östrogen bindet nun über die ligandenbindende Domäne (LBD) an spezifische, hormonregulierende DNA Sequenzen, die ERE (Östrogen-responsive Elemente), die sich im Bereich der regulatorischen Zielgene befinden (Mödder, 2010). Dort verbinden sich diese Strukturen zu einem Transkriptionsapparat. Dies kann direkt oder durch koregulatorische Proteine über Koaktivatoren oder Korepressoren indirekt erfolgen, wobei Koaktivatoren hier die Transkription verstärken und Korepressoren sie abschwächen (McKenna, Lanz, & O'Malley, 1999). Eben diese Kofaktoren sind für eine optimale Re-

Einleitung

gulierung der Östrogenwirkung am Knochen bei der Transkription über ligandengebundene Östrogenrezeptoren notwendig. Als wichtiger Bestandteil der Regulierung der Steroidhormone sei an dieser Stelle die Steroidrezeptor-Koaktivator-Genfamilie (Src) erwähnt, welche aus drei Mitgliedern besteht: SRC-1, SRC-2 und SRC-3, die untereinander eine 40%ige Homologie besitzen (J. Xu & O'Malley, 2002). Koaktivatoren interagieren spezifisch mit bestimmten Rezeptoren. Ihre Wirkung ist zelltypspezifisch. Dabei binden die Koaktivatoren der SRC an ligandenaktivierte Zellkernrezeptordimere wie beispielsweise $ER\alpha$ und $ER\beta$, den Androgenrezeptor oder PPAR, woraufhin über zusätzliche Bindung von Transkriptionsaktivatoren ein Transkriptionskomplex gebildet werden kann. Dieser sorgt durch Azetylierung von Histonen für eine Änderung der Chromatin-Struktur im Bereich des Zielgen-Promotors, und somit wird über die RNA-Polymerase die Transkription initiiert (Mödder, 2010).

Der nicht-klassische Signalweg findet statt, indem Rezeptoren hormonegebundene Zielgene aktivieren, ohne dass EREs im Promotorbereich vorhanden sind. Der Östrogenrezeptor geht hierbei eine Interaktion mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren ein, die eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Östrogen-Effekte einnehmen (Paech et al., 1997). Dazu gehören AP-1 als Transkriptionsfaktor über $ER\alpha$ und $ER\beta$, SP1 über $ER\alpha$ zur Regulierung der Genexpression, $NF\kappa B$ über $ER\alpha$, um die Genexpression über IL-6- zu hemmen, und FoxA1, welches am Chromatin über $ER\alpha$ als Transkriptionsfaktor für eine ER abhängige Transkription zuständig ist (Carroll & Brown, 2006; Monroe et al., 2005; Qin, Samudio, Ngwenya, & Safe, 2004; Ray, Prefontaine, & Ray, 1994; Samudio et al., 2001; Saville et al., 2000; Sun, Porter, & Safe, 1998). Hierbei können bei den beiden Rezeptoren unterschiedliche Effekte auf die Transkriptionsfaktoren entdeckt werden. So kann anhand des Beispiels am AP-1 beobachtet werden, dass $ER\alpha$ seine Aktivität induziert, während $ER\beta$ hierauf keinen Effekt hat. Das Interessante beim Vergleich dieser beiden Signalwege ist, dass die Mehrheit der Gene, die über $ER\alpha$ reguliert werden, die Transkriptionsfaktoren des nicht-klassischen Weges enthalten, während nur 11% ERE als responsives Element des klassischen Weges aufzuweisen haben (Levy et al., 2008). Versuche haben ergeben, dass die Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichtes zwischen klassischem und nicht-klassischem Weg sehr wichtig ist, da eine Verschiebung dieses Verhältnisses starke biologische Auswirkungen nach sich zieht (Mödder, 2010).

1.2.3.2 Nicht-genomischer Signalweg

Neben den Östrogenrezeptoren, die sich im Zytosol befinden, sind 5-10% der Östrogenrezeptoren, obwohl sie vom molekularen Aufbau her identisch mit den zellkerngebundenen ERs sind, an die Zellmembran gebunden (Pedram, Razandi, & Levin, 2006). Diese membrangebundenen ERs sind assoziiert mit G-Proteinen, welche sie auch aktivieren können und welche über Bildung von Kalzium und cAMP zur Aktivierung weiterer Kinasen (z.B. Src, AKT, ERK, PI3K) führen. Somit findet bei der nicht-genomischen Aktivität als Antwort auf die Bindung von Östrogen an den membrangebundenen Östrogenrezeptor die Aktivierung des Src/ERK-Signalweges statt.

Für die ERK-Aktivierung sind zunächst die Membran-Lokalisation des Rezeptors und die Bindung an Caveolin-1 unbedingt notwendig (Aguirre et al., 2007). Die Aktivierung der ERKs sorgt für einen hemmenden Effekt der proapoptischen Agenten der Dehnung. Es erfolgt die Interaktion von ER α mit der Src2-Homologie-Domäne (Migliaccio et al., 2000) und die Bindung an Caveolin-1 (Schlegel, Wang, Katzenellenbogen, Pestell, & Lisanti, 1999; Schlegel, Wang, Pestell, & Lisanti, 2001), was zu einer erhöhten Transkriptionsaktivität des Rezeptors führt. Letztendlich kommt es über diese Aktivierungen zur Phosphorylierung von Proteinen, zur Initiierung von Zellbewegung, Zellvermehrung und zur Unterdrückung der Apoptose (Mödder, 2010). In den Caveolae befinden sich ER α und ER β , die dort bezogen auf Östrogen zelluläre Funktionen vermitteln (K. Chambliss et al., 2000; Chambliss, Yuhanna, Anderson, Mendelsohn, & Shaul, 2002; K. L. Chambliss et al., 2000; Levin, 2002). Das Auseinanderreißen von Caveolae sorgt für eine Verminderung mechanisch induzierter ERK-Aktivierung und ebenso für die Minderung von ERK-Überleben (Aguirre et al., 2007). Die Mechanotransduktion hängt somit zum einen von der Umgebung und den physikalischen Interaktionen und zum anderen auch von den Struktur- und Signalmolekülen innerhalb der Caveolae ab (Aguirre et al., 2007). Diese membrangebundenen Rezeptoren sind verantwortlich für die schnelle Weiterleitung von Östrogeneffekten, zum Beispiel dem antiapoptischen Effekt. Es hat sich herausgestellt, dass der nicht-genomische Signalweg in Knochenzellen eine wichtige Rolle für die Regulierung der Apoptose spielt (Mödder, 2010). Eine Dysfunktion im Bereich dieses Signalmechanismus kann die Basis für eine erhöhte Zerbrechlichkeit des Knochens sein, wie es zum Beispiel bei der Osteoporose der Fall ist. So kommt es unter alltäglicher Belastung nicht mehr zu einer optimalen Anpassung des Knochens an die herrschenden Bedingungen und somit zu einem erhöhten Frakturrisiko (Aguirre et al., 2006).

Einleitung

Das Vorhandensein von ER α und β ist notwendig, damit es durch mechanische Induktion zu einer ERK-Aktivierung in Osteoblasten und -klasten kommen kann. Die Lokalisation der ER α in der Plasmamembran und seine Interaktion mit Caveolin-1 wird im Rahmen der Mechanotransduktion für die Aktivierung der ERK benötigt (Aguirre et al., 2007). Hierbei spielt deren Palmitoylation der LBD des Östrogenrezeptors eine entscheidende Rolle, indem sie die Lokalisation in der Plasmamembran bewerkstelligt (Acconcia, Bocedi, Ascenzi, & Marino, 2003). Bei Mäusen mit KO in ER α und β kommt es zu keiner ERK-Aktivierung in Bezug auf mechanische Stimulation. Dieses Manko kann durch Transfektion von ER α oder β teilweise revidiert werden, denn Transfektion von ER α und β verleiht wieder volle Überleitung auf mechanische Stimulation (Aguirre et al., 2007). Dehnung erhöht die Anzahl der Zellen, die mit einer nukleären ERK-Akkumulation einhergehen um 100%. Die ligandenbindende Domäne der ERs genügt somit, um dehnungsaktivierte ERKs zu aktivieren und suggeriert, dass für die Bindung eine Ligandenbindung nicht beansprucht werden muss. Zudem reicht sie aus, um den östrogenabhängigen antiapoptotischen Effekt zu vermitteln (Kousteni et al., 2001). Insofern ist die ligandenbindende Domäne eines jeden Rezeptors fähig, über den ligandenunabhängigen Weg Verantwortung für mechanische Stimuli zu übernehmen (Aguirre et al., 2007).

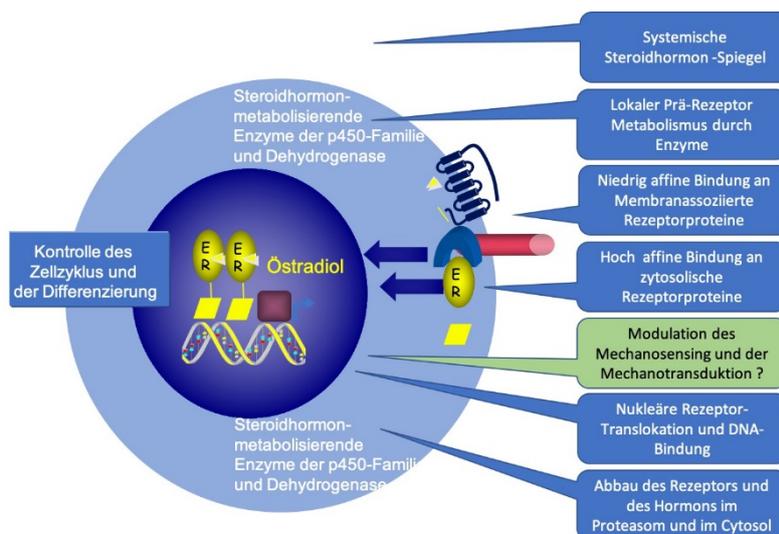


Abbildung 6: Steroidhormonmetabolismus. Aktive Hormone binden an Rezeptoren, die an der Zellmembran und im Zellkern Signaltransduktion bewirken (modifiziert nach Dr. med. L. Seefried). (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. F. Jakob).

1.3 Osteoporose

1.3.1 Definition

Osteoporose ist eine Skeletterkrankung, die durch eine verminderte Knochenfestigkeit und einen pathologischen Knochenverlust charakterisiert ist. Durch strukturelle und funktionelle Defizite kommt es hierbei zu Fragilitätsfrakturen. Die Verminderung der Knochenfestigkeit entsteht durch angeborenen oder erworbenen generalisierten, pathologischen Schwund an Knochenmasse in Verbindung mit einer Störung der Mikroarchitektur (Rüther, Lohmann, & Pitzen, 2014). Die klinisch bedeutsamste Folge ist die Häufung von Schenkelhals-, Radius-, Humerus- und Wirbelkörperfrakturen (Rüther et al., 2014).

1.3.2 Epidemiologie

Osteoporose ist die häufigste Knochenerkrankung im höheren Lebensalter. 80% aller Osteoporoseerkrankungen betreffen postmenopausale Frauen. Osteoporose wird in die primäre und die sekundäre Osteoporose unterteilt, wobei 95% der Osteoporoseerkrankungen primär entstehen und lediglich 5% sekundär (Herold, 2010). Diese sekundäre Form der Osteoporose entsteht oft im Rahmen einer Behandlung mit Glukokortikosteroiden oder Heparin oder im Rahmen einer Immobilisation; auch endokrine Erkrankungen wie Überfunktionen der Nebenniere, der Nebenschilddrüse und der Schilddrüse können eine sekundäre Osteoporose verursachen (siehe unten). Die primäre Osteoporose weist einen erblichen Anteil mit polygenetischem Erbmodus auf, der erheblich durch äußere Faktoren wie Lebensweise und Begleiterkrankungen individuell abgewandelt werden kann. Laut WHO gehört die Osteoporose als chronische Erkrankung neben dem Diabetes Mellitus, der Arteriosklerose und der Adipositas zu den wichtigsten Volkskrankheiten (Herold, 2010).

1.3.3 Ätiologie und Pathogenese

Am gesunden Knochen werden Stabilität, Zusammensetzung und Struktur des Knochens durch ein geregeltes Zusammenspiel aus Knochenaufbau und Knochenabbau aufrechterhalten. Hierbei findet ein kontinuierlicher Knochenumbau statt, das sogenannte Remodelling. Während bis zum 30. Lebensjahr der Knochenaufbau überwiegt und der Knochen zu diesem Zeitpunkt seine höchste Knochenmasse aufweist, kommt

Einleitung

es nach dem 40. Lebensjahr zu einem kontinuierlichen Knochenverlust, der bei Frauen zum Verlust von ca. 40% des kortikalen Knochens und ca. 60% des spongösen Knochens führt und somit eine Altersatrophie des Knochens hervorruft (Niethard, Pfeil, & Biberthaler, 2009; Rüter et al., 2014). Bei Männern sind diese Verluste weniger stark ausgeprägt.

Knochenverlust entsteht meistens entweder durch einen ungezügelter Abbau der Knochenmasse oder durch einen Defekt in der Regeneration des funktionell minderwertigen, alten Knochens (Lothar Seefried et al., 2010). Hat die Verminderung der Knochenmasse einen Punkt erlangt, an dem der Verlust so sehr überwiegt, dass es zur Ausbildung pathologischer Frakturen kommt, d.h. zu Frakturen, denen kein adäquates Trauma vorangegangen ist, dann übersteigt der Knochenmasseverlust die physiologischen Vorgänge der Altersatrophie des Knochens und die Vorgänge des Knochenabbaus erhalten den Krankheitswert einer Osteoporose (Rüter et al., 2014). Diese wird in erster Linie durch einen Spongiosaverlust des Knochens gekennzeichnet (Niethard et al., 2009). Ursachen, die dafür sorgen, dass der Knochenabbau das Maß der physiologischen Altersatrophie übersteigt, können vielfältig sein und auch nebeneinander vorkommen und somit einen Summationseffekt auslösen. Sie können entweder auf dem Boden einer vermehrten Osteoklastenaktivität oder einer verminderten Aktivität der Osteoblasten vorkommen sowie durch eine Kombination beider Faktoren, die zu einem Strukturverlust und Knochenmasseverlust des Knochens führen (Rüter et al., 2014).

Wie bereits erwähnt wird die Osteoporose in eine primäre und eine sekundäre unterteilt. Zu den Ursachen der primären Osteoporose zählen die postmenopausale Osteoporose (Typ I Osteoporose; spongiosabetonter Knochenmasseverlust), die senile Osteoporose (Typ II Osteoporose; Spongiosa und Kompakta betreffender Knochenmasseverlust) und die idiopathische Osteoporose junger Männer, die jedoch sehr selten ist (Herold, 2010). Während bei der postmenopausalen Osteoporose durch den Östrogenmangel die östrogenvermittelte Osteoklasten-Hemmung entfällt, kommt es bei der senilen Osteoporose durch Osteoblasten-Insuffizienz und Osteozyten-Untergang zum Knochenmasseverlust (Rüter et al., 2014).

Zu den Ursachen der sekundären Osteoporose zählen endokrine Ursachen wie Hyperkortisolismus, Hypogonadismus und Hyperthyreose, Immobilisation, das Malabsorptionssyndrom mit verminderter Zufuhr von Kalzium und/oder Vitamin D und die

Einleitung

iatrogene oder medikamentöse Osteoporose nach Langzeittherapie mit Kortikosteroiden ($> 5\text{mg}$ Prednisolon /d) oder Heparin (Rüther et al., 2014). Die klinisch wichtigste Ursache einer sekundären Osteoporose stellt hierbei die chronische Therapie mit Glukokortikoiden dar, deren langfristige Einnahme zu einer Reihe von Störungen im Knochenstoffwechsel führt. Neben einer gesteigerten Produktion von RANKL, welches für die Entwicklung und Aktivierung von Osteoklasten essentiell ist und daher für eine beschleunigte Resorption sorgt, und einer Hemmung der OPG-Synthese, was eine Verminderung der RANKL Inaktivierung nach sich zieht und somit letztendlich auch knochenresorbierend wirkt, führt die langfristige Einnahme von Glukokortikoiden auch zu Fehlregulationen in der osteogenen Differenzierung und Regeneration (Jakob et al., 2010). In diesem Zusammenhang sei noch ergänzt, dass sich mit der Kenntnis dieser unterschiedlichen Einflüsse auf das Knochengewebe auch erklärt, warum bei dieser Form der sekundären Osteoporose therapeutisch sowohl eine antiresorptive als auch eine anabole Therapiestrategie angestrebt werden kann. Zum Thema Osteoporose und Glukokortikoide sei noch erwähnt, dass der Einsatz von Glukokortikoiden bei Osteoporosepatienten nicht grundsätzlich kritisch anzusehen ist. Besonders bei Patienten mit aktiven chronischen Entzündungen, die ihrerseits einen Risikofaktor für den Knochenverlust darstellen, ist ein Glukokortikoide-Einsatz in der kurzfristigen Therapie explizit erwünscht, da diese effektiv für einen Entzündungsrückgang sorgen. Ihrerseits zum Risikofaktor werden sie dagegen bei langfristiger Anwendung, sodass die Indikation hier streng gestellt werden sollte (Compston, 2010; David & Schett, 2010).

Neben den erwähnten Formen der Osteoporose gibt es auch noch andere Mechanismen zur Entstehung der Osteoporosekrankheit, wie hereditäre Formen oder Erkrankungen, die mit der Osteoporose assoziiert sein können. Auf diese möchte ich hier jedoch nicht weiter eingehen. Osteoporose kann des Weiteren je nach metabolischem Charakter eingeteilt werden. Die Patienten mit hohem Turnover des Knochens (früher als Fast-loser-Patienten bezeichnet) haben einen Knochenmassenverlust bei gesteigertem Umbau zu verzeichnen. Sie haben somit einen hohen Umsatz und sind z.B. typisch für die früh nach der Menopause eintretende Osteoporose. Bei niedrigem Knochen turnover (Slow-loser-Patienten) besteht ein Knochenmasseverlust bei reduziertem Umbau und reduzierter Regeneration; dieser Typ ist charakteristisch für das verzögerte Auftreten der Erkrankung 10 Jahre nach der Menopause (früher auch als senile Osteoporose bezeichnet) (Herold, 2010).

1.3.4 Risikofaktoren der Osteoporose

Der Einfluss der Risikofaktoren bei der Entstehung der Osteoporose ist bedeutend und darf daher nicht unterschätzt werden. Sie können in Faktoren eingeteilt werden, die therapeutisch beeinflussbar sind und Faktoren, die nicht beeinflussbar sind. Ihr Vorhandensein und ihr Zusammenspiel mit den individuellen genetischen Grundlagen des jeweiligen Individuums können für die Manifestation der Krankheit verantwortlich sein. Nicht beeinflussbare, wichtige Risikofaktoren sind das Alter, das weibliche Geschlecht und genetische Faktoren, therapeutisch beeinflussbar hingegen sind eine verkürzte Östrogenexpositionszeit (unter 30 Jahre), die Knochenmasse, körperliche Inaktivität und Sturzgefahr, starker Zigaretten- und/oder Alkoholkonsum und Ernährungsfaktoren (Kachexie und Mangel an Calcium und Vitamin D) (Jakob et al., 2010). Von diesen einzelnen Faktoren möchte ich gerne einige aufgreifen und näher erläutern.

1.3.4.1 Alter und Genetik als Risikofaktoren

Der genetische Anteil am Aufbau der Knochenmasse und der Anatomie des Knochens wird mit 60-80% angegeben (Lothar Seefried et al., 2010). Zudem ist hinsichtlich der genetischen Grundlagen der Osteoporose bekannt, dass es sich um eine polygenetische Krankheit handelt, deren Entstehung Polymorphismen mehrerer Kandidatengene zugrunde liegen. Hierbei handelt es sich zumeist um Gene, die eine wesentliche Rolle im Knochenstoffwechsel spielen und in die Regulation der Mechanotransduktion eingebunden sind, wie beispielsweise RANK/RANKL, OPG, ER α oder Osteopontin (Ralston, 2010; X. H. Xu et al., 2010). Die jüngste Forschung identifiziert sukzessive jene genetischen Defekte, die bei der frühzeitig einsetzenden Osteoporose als dominierende Risikofaktoren in den Vordergrund treten. Hier mag in Zukunft eine Subpopulation von PatientInnen zu identifizieren sein, die sehr frühzeitig von Osteoporose betroffen ist. Der Alterungsprozess ist ein Prozess komplexer Interaktionen, an dem verschiedene Systeme beteiligt sind. Hierbei handelt es sich um eine Kombination aus zellulären und erblichen Faktoren, systemischen Vorgängen, welche die einzelnen Organe betreffen, und sehr individuellen Faktoren wie der Lebensweise inklusive der Ernährung. Dabei wird die jeweilige polygenetische Anlage individuell durch die Lebensumstände, die Umgebung und verschiedene unterliegende Erkrankungen moduliert. Aus dem Zusammentreffen der verschiedenen Parameter ergibt sich schließlich das für jeden Menschen höchst individuelle Osteoporose-Risiko.

1.3.4.2 Hormonmangel als Risikofaktor

Östrogene haben neben ihrer Wirkung im Bereich der weiblichen Reproduktions- und Geschlechtsorgane auch einen entscheidenden Einfluss auf den Knochenstoffwechsel. Sie sorgen mit dafür, dass Knochenzellen für mechanische Reize sensibilisiert werden (Mechanosensitivität) und bremsen die Aktivität der Osteoklasten. Folglich führt ein Östrogen-Mangel durch Osteoklastenenthemmung entscheidend dazu, dass es zu einem sehr schnell verlaufenden Knochenabbau kommt (Frenkel et al., 2010; Shuster, Rhodes, Gostout, Grossardt, & Rocca, 2010). Zudem kommt es durch Verlust der Mechanosensitivität zu einer Entkopplung in Bezug auf die biochemischen und physikalischen Signale, wodurch das RANKL-System zusätzlich gestärkt wird (Jakob et al., 2010). Dieser Ursache der Osteoporose-Manifestation wird am besten durch eine Therapie begegnet, die die Osteoklastenhemmung durch Gabe von Bisphosphonaten oder einer Neutralisation des Hauptmediators RANKL in Form von Antikörpern (Denosumab) bewirkt (Lewiecki, 2010; Russell, Watts, Ebetino, & Rogers, 2008). Vielversprechend wäre ein therapeutischer Ansatz, der die bei Osteoporose verminderte bis nicht vorhandene Mechanosensitivität wiederherstellen oder verbessern könnte.

1.3.4.3 Immobilisation und Sturzkrankheit / Frailty

Bei der Immobilisation handelt es sich um einen sehr wichtigen Risikofaktor im Rahmen der Entstehung der Osteoporose, da sie einerseits innerhalb eines sehr kurzen Zeitraumes eine überaus große Rolle spielen kann und andererseits ein Risikofaktor ist, der sehr gut modifiziert werden kann. Bereits nach zwei Wochen der Immobilisation, sei es passiv, durch aktive Krankheit, lähmungsbedingt oder durch mangelnde aktive Bewegung und sitzende Lebensweise wird ein Defizit im Bereich der Signalkaskaden der Mechanotransduktion festgestellt (Jakob et al., 2010). Aufgrund der geringen Anforderungen, die die Umgebung an das Knochengewebe stellt und welche über Signale erkannt werden, wird der vorhandene, als unnötig empfundene Überschuss an Knochensubstanz über die Mechanismen des RANK/RANKL-Systems sowie über den Sclerostinmechanismus sofort wieder abgebaut, erkennbar an einer Erhöhung der Knochenresorptionsmarker (Ozcivici et al., 2010). Dies geschieht innerhalb kurzer Zeit und der Knochen braucht nach Beendigung der Ursache für die Immobilisation vergleichsweise lange, um diesen Substanzabbau wieder zu kompensieren. Während die eben erläuterte Immobilisation nicht nur in einer konkreten Alters-

gruppe auftritt, sondern aus unterschiedlichen, alle Altersgruppen betreffenden Gründen entstehen kann, handelt es sich bei der Sturzkrankheit um einen zusätzlichen Risikofaktor, der besonders ältere Patienten betrifft. Hierbei kommt es auf der Basis der durch die Osteoporose bereits verminderten Frakturresistenz durch weitere Faktoren wie den Verlust neuromuskulärer Koordination, Muskelschwund oder kognitive Defizite zu einer erhöhten Gefahr, Knochenbrüche durch leicht auftretende Stürze zu erleiden (Lothar Seefried et al., 2010). In diesem Fall muss durch frühzeitige Diagnostik im Rahmen geriatrischer Assessments und durch eine darauffolgende effektive Therapieanpassung im Sinne von Muskeltraining, Sturzprävention, Vitamin D-Supplementierung und optimaler Anpassung der Lebensbedingungen diesem zusätzlichen Risiko entgegengewirkt werden (Lothar Seefried et al., 2010).

1.3.5 Klinik

Der Unterschied zwischen der physiologischen Altersatrophie und der Osteoporose besteht darin, dass es bei der Osteoporose z.B. zu Wirbelkörperdeformierungen kommt, ohne dass vorausgehend ein adäquates Trauma vorliegt. Daher sind die körperlichen Probleme, die beim Krankheitsbild der Osteoporose auftreten, hauptsächlich Symptome, die durch die Frakturkrankheit zustande kommen.

Klinisch beklagen die Patienten bei aktiven Fragilitätsfrakturen Knochenschmerzen, die besonders im Bereich des Rückens bestehen (Niethard et al., 2009). Durch Deformierungen der Wirbelsäule entstehen Gefügestörungen und sorgen für die typischen Symptome der Osteoporose: akute Schmerzen nach Überlastung der Wirbelsäule und chronische Rückenschmerzen (Niethard et al., 2009). Diese Schmerzen sind dumpf, können nicht genau lokalisiert werden und werden in der Tiefe der Wirbelsäule empfunden. Mit Zunahme der Verformungen kommt es zu einer Kyphose der Wirbelsäule im Thorakalbereich und zu einer kompensatorischen Hyperlordose im Bereich der Lendenwirbelsäule (Niethard et al., 2009). Hierdurch kommt es an der Bauchdecke zu einer Vorwölbung, des Weiteren zeigen sich ein Verlust der Körperhöhe und durch die verminderte Rumpfhöhe dorsal entstehende Hautfalten, welche als Tannenbaumphänomen bezeichnet werden (Niethard et al., 2009).

1.3.6 Diagnostik

Ziel der Diagnostik bei der Osteoporose ist die Einschätzung von klinischen Risikofaktoren und der Knochendichte. Letztere kann anhand der Densitometrie gemessen werden. Dies geschieht entweder durch Messung der Flächendichte des Knochenmineralgehalts an der Wirbelsäule oder am proximalen Femur (DEXA oder DXA), durch Messung der Knochenvolumen-Mineraldichte mithilfe der quantitativen Computertomographie an der Wirbelsäule (QCT) oder (weniger gut evaluiert und klinisch nicht in die Routine übernommen) mithilfe der Ultraschalltransmissionsgeschwindigkeit an der Kniescheibe oder am Fersenbein (Herold, 2010). Hierbei zeigt sich im Fall einer Osteoporose ein verminderter Mineralgehalt des Knochens und im Rahmen einer Langzeitkontrolle ein erhöhter Verlust an Knochenmasse. Die Standardabweichung (SD) unterhalb des Mittelwertes der Knochendichte gesunder Menschen im Alter von 30 Jahren wird als T-Score angegeben. Dieser Wert wird zur Stadieneinteilung und Risikoevaluation verwendet. Laborwerte weisen bei der Osteoporose normalerweise keine Veränderungen auf, die Bestimmung von Kalzium, Phosphat, Parathormon und alkalischer Phosphatase kann jedoch zur differentialdiagnostischen Abklärung hilfreich sein (Herold, 2010). Durch Laboruntersuchungen kann Aufschluss über Ursachen für eine sekundäre Osteoporose gegeben werden. Zudem gibt es Marker, die einen Hinweis auf die Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten geben. Für Osteoblasten wird hierzu das Serumosteokalzin und für die Osteoklasten Desoxypyridinolin und die Cross-link-Telopeptide bestimmt (Herold, 2010). Die Röntgendiagnostik lässt die Osteoporose leider erst in späteren Stadien ab einer Verminderung der Knochenmasse um 30% anhand einer erhöhten Strahlendurchlässigkeit und typischer Wirbelsäulenveränderungen wie Keil- und Fischwirbel erkennen und ist daher nicht zur Frühdiagnostik geeignet (Niethard et al., 2009). Auf eine früher angewandte Stadieneinteilung wird heutzutage verzichtet und stattdessen eine risikoadaptierte Case-Finding-Strategie angewandt, bei der das 10-Jahresfrakturrisiko als Pendant zur Stadieneinteilung dient.

Definiton	Knochendichte	Strategie
Normal	bis max. 10% Verlust T-Score > -1 SD	Prävention
Osteopenie	10 bis 25% Verlust	

Einleitung

	-1 SD > T-Score > -2,5 SD	
Osteoporose	Verlust über 25% T-Score < - 2,5 SD	Behandlung
Schwere Osteoporose	Osteoporose mit Fraktur(en)	

Tabelle 1 WHO-Definition der Osteoporose (diagnostische Kriterien) (Herold, 2010)

1.3.7 Therapie

Die Therapie der Osteoporose setzt sich aus den Möglichkeiten eines Basisprogrammes, einer nicht-medikamentösen Therapie, einer spezifisch medikamentösen Therapie und einer operativen Therapie zusammen.

1.3.7.1 Basisprogramm

Die Basistherapie besteht sowohl aus der Lebensumstellung auf kalziumreiche Ernährung, Bewegung und physikalischer und krankengymnastischer Therapie als auch aus der Supplementierung mit Kalzium und Vitamin D als Basistherapie (Faßbender, 2006). Zur Schmerzbekämpfung werden Antirheumatika und Analgetika eingesetzt. Zudem gilt es, bereits erkannte Ursachen einer sekundären Osteoporose zu bekämpfen und Risikofaktoren (siehe 1.3.4) zu vermeiden (Rüther et al., 2014).

1.3.7.2 Nicht-medikamentöse Therapie

Hierbei handelt es sich um ein physikalisches und krankengymnastisches Behandlungsprogramm im Sinne von Krankengymnastik, Koordinations- und Vigilanztraining, Miederversorgung und Vermeidung des Sturzrisikos durch spezielles Falltraining und Hüftprotektoren (Herold, 2010).

1.3.7.3 Spezifische medikamentöse Therapie

Bei der medikamentösen Behandlung werden die verwendeten Pharmaka je nach ihrer durch Studien nachgewiesenen Wirksamkeit in unterschiedliche Medikamentenklassen (nach vorhandener Evidenz) eingeteilt. Bei der verfügbaren Evidenz handelt es sich einerseits um den unzweifelhaften Wirkungsnachweis in entsprechenden klinischen Studien, andererseits wird der Evidenzgrad auch durch die Qualität und die Größe von Studien beeinflusst, was wiederum nicht alleine von der Qualität der Medikamente abhängt.

Einleitung

Die größte nachgewiesene Wirksamkeit hat die Medikamentenklasse A1, zu der die Bisphosphonate gehören (Faßbender, 2006). Bisphosphonate werden in die mineralisierte Knochenmatrix eingelagert und kontinuierlich bei der Knochenresorption freigesetzt. Sie üben durch Hemmung der Osteoklasten eine antiresorptive Wirkung aus und erhöhen somit die Knochendichte (Karow & Lang-Roth, 2010). Bisphosphonate senken die Inzidenz vertebraler und extravertebraler Frakturen um 50% (Herold, 2010) und kommen vor allem bei der high turnover (postmenopausalen) Osteoporose zum Einsatz.

Eine weitere, sehr häufig angewandte medikamentöse Therapiemethode ist der Einsatz von monoklonalen RANKL-Antikörpern (Denosumab). Denosumab imitiert die Wirkung von OPG, blockiert die Bindung von RANKL an RANK und wirkt somit der Osteoklastendifferenzierung und damit der Knochenresorption entgegen.

Als Medikamentenklasse mit etwas geringerer Evidenz (A2) stehen die SERMs (selective estrogen receptor modulators) zur Verfügung, wie zum Beispiel Raloxifen. Raloxifen wirkt am Knochen östrogenagonistisch und sorgt damit für die Hemmung des Knochenabbaus, bei deutlicher östrogenantagonistischer Wirkung an Mamma und Uterus (Karow & Lang-Roth, 2010). Bei der postmenopausalen Osteoporose kommt es zu einer Senkung vertebraler Frakturen um 30-50% in Kombination mit der Basistherapie, bestehend aus Calcium und Vitamin D. Ein Effekt auf die Schenkelhalsfrakturen konnte nicht nachgewiesen werden, möglicherweise auch, weil die getesteten Populationen vergleichsweise jung waren und eine niedrige Inzidenz an Femurfrakturen hatten (Karow & Lang-Roth, 2010). Parathormon wird auch als Medikament der Medikamentenklasse A2 bei der Behandlung der Osteoporose eingesetzt (Herold, 2010). Als subkutane Injektion oder kurzzeitige Injektion und einer damit verbundenen Erhöhung des Serumspiegels für maximal zwei Stunden am Tag führt es zu einer Anregung der Osteoblasten (Preisinger, 2007). Diese Anwendung führt als Folge der Knochenneubildung zu einer Erhöhung des Knochenstoffwechsels mit positivem Effekt auf die trabekuläre Masse. Fluoride wurden in die Medikamentenklasse B eingestuft, da die Studienergebnisse recht widersprüchlich sind (Herold, 2010). Es kommt zwar zu einer Verminderung der Frakturrate, dies geschieht jedoch nur im Wirbelsäulenbereich (Herold, 2010). Fluoride haben zudem ein enges therapeutisches Fenster. Sie stimulieren die Osteoblasten und sorgen somit für eine positive Ca^{2+} /Knochenbilanz (Karow & Lang-Roth, 2010). Ebenso führen sie zu verstärkter Osteoidbildung, was

radiologisch durch eine Zunahme der Knochendichte sichtbar wird, jedoch gibt es kontroverse Diskussionen in Bezug auf die Festigkeit des neu entstandenen Knochens (Karow & Lang-Roth, 2010). Der Einsatz von Fluor fand vor allem im Bereich der senilen Osteoporose statt; es wird heute kaum mehr eingesetzt. Kalzitonin vom Lachs hemmt die Osteoklasten und hat zusätzlich einen analgetischen Effekt (Karow & Lang-Roth, 2010). Daher war die Anwendung bei osteoporotischen Knochenschmerzen durch Trabekleinbrüche in Phasen hohen Knochenumsatzes oder auch bei Knochenmetastasen indiziert (Herold, 2010). Aufgrund lückenhafter Studienbeweise wurde es in die Medikamentenklasse C eingestuft (Herold, 2010). Menschliches Kalzitonin hat eine völlig andere Wirkung. Da Lachs-Kalzitonin in den Verdacht kam, bestimmte Tumore zu fördern, ist es heute aus dem Katalog der antiosteoporotischen Medikamente gestrichen. Östrogene wirken bei der postmenopausalen Osteoporose antiresorptiv. Aufgrund eines erhöhten Risikos für einen Herzinfarkt, einen Schlaganfall, eine Thrombose oder Brustkrebs wird vom längerfristigen Einsatz von Östrogenen abgeraten (Herold, 2010).

1.3.7.4 Operative Therapie

In sehr fortgeschrittenen Stadien kommt zur Schmerzreduktion die Anwendung von Zementeinspritzung im Sinne einer Vertebroplastie oder Kyphoplastie zur Stabilisierung von sinternden Wirbelkörpern in Frage (Niethard et al., 2009). Durch Einspritzung von Zement in die spongiösen Hohlräume und der damit verbundenen Stabilisierung kann es zu einer erheblichen Schmerzreduktion kommen.

1.3.7.5 Sport- und Bewegungstherapie

Durch einschlägige Studien ist nachgewiesen, dass sportliche Aktivität, gezielte Physiotherapie und Bewegungstherapie die Sturzrate reduzieren und zum Erhalt der Knochendichte beitragen können. Eine der eindrucksvollsten Studien zur Frakturwirksamkeit sportlicher Aktivität ging aus der Erlanger Arbeitsgruppe hervor. Im Großen und Ganzen ist die Datenlage zur multimodalen Therapie der Osteoporose durch Krafteintrag allerdings noch sehr dünn. Wie oben angeführt sind die Kenntnisse über die molekularen Mechanismen unvollständig. Eine wesentliche Motivation dieser experimentellen Arbeit ist es, die Kenntnisse in diesem Bereich zu erweitern, um letztlich verbesserte Grundlagen für therapeutische Interventionen zu entwickeln (Kemmler, Bebenek, Kohl, & von Stengel, 2015; Kemmler, Kohl, & von Stengel, 2017).

1.4 Zielsetzung der vorliegenden Promotionsarbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen Beitrag zur Aufklärung der molekularen Wirkungsmechanismen von Östrogen- vermittelten Einflüssen auf die mechanische Empfindlichkeit des Knochens zu leisten. Insbesondere sollte mittels genetisch veränderter Zellen nachgewiesen werden, dass Östrogen-responsive Elemente durch mechanische Reizung von Zellen aktiviert werden können und welche molekularen Einflüsse diese Aktivierung modulieren und mit Östrogenen in diesem Zusammenhang interagieren. Die Klonierungsarbeiten zur Herstellung von Konstrukten, welche durch transiente Expression oder durch permanente Expression in genetisch veränderten Zelllinien als Instrumentarium zur Aufklärung der molekularen Zusammenhänge dienen könnten, war ein wichtiges Ziel dieser Arbeit. Weitere Arbeiten sollten der stabilen Expression von Reporter-Gen-Konstrukten und von Östrogen-Rezeptoren dienen, damit ein vollständiger Baukasten zur Testung des Einflusses von Östrogenen auf das Mechanosensing und die Mechanotransduktion erstellt werden konnte. Zur vergleichenden Beurteilung der Aktivität der Östrogen-responsiven Konstrukte sollten in dieser Arbeit die bereits vorhandenen mechanoresponsiven Konstrukte zur Aktivität AP-1 und SP-1 verwendet und weiter charakterisiert werden und interaktive Phänomene mit diesen Konstrukten untersucht werden.

2 Material

2.1 Geräte

Geräte	Hersteller
AxioCam MRC	Zeiss
Axioskop 2	Zeiss
BioPhotometer	Eppendorf
Biofuge	Heraeus
Brutschrank, Inkubator HERAcell 240	Heraeus
Densitometer	VILBER LOURMAT Deutschland GmbH
Elektrophoresekammern	Peqlab Biotechnologie GmbH
GENE PULSER ® II	BIO-RAD
Heizblöcke	HLC-Haep Labor Consult
Heizrührplatte	Gerhardt
Megafuge 1.0	Heraeus SEPATECH
Mikropipetten 10µl, 100µl, 1000µl	ABIMED
Mikroskop	Hund WETZLAR
Mikrowelle	SHARP
Multifuge 1 S-R	Heraeus
Multipette plus	Eppendorf
Orion II Microplate Luminometer	Berthold Detection Systems
Pipetboy	BRAND
Schüttler	lab4you
Sterilwerkbänke	Heraeus Lamin Air®
Speed Vac®	Savant
Thermocycler peQSTAR	peqLab Biotechnologie GmbH
Thermocycler Primus	MWG-BIOTECH
Thermocycler primus 25	peqLab Biotechnologie GmbH
Thermocycler PTC-200 Peltier Thermal	Biozym Diagnostik GmbH
Thermocycler MJ Research	Biozym Diagnostik GmbH
UV-Tisch	Angewandte Gentechnologie Systeme
Vortexer	Hartenstein, IKA®
Waage Scout II	OHAUS®
Wasserbad	GFL® 1083

2.2 Chemikalien

Es wurden Chemikalien der Firmen AppliChem GmbH, Applied Biosystems, Invitrogen GmbH, Carl Roth GmbH und Sigma Aldrich GmbH in p. A. Qualität verwendet.

2.3 Verbrauchs- und Zellkulturmaterialien

Material	Hersteller
Reaktionsgefäße	Greiner bio-one
Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one
Pipettenspitzen	Abimed
25 cm ² , 75 cm ² Zellkulturflaschen	Biochrom
Zellschaber 24 cm, 30 cm	Biochrom
Multiwell Platten	Greiner bio-one
DMEM High Glucose (4,5g/l)	PAA Laboratories GmbH
DMEM / Ham`s F12	PAA Laboratories GmbH
FCS (Foetal Bovine Serum Standard)	PAA Laboratories GmbH
Trypsin-EDTA (1x)	PAA Laboratories GmbH
L-Glutamin 200 mM (100x)	PAA Laboratories GmbH
Ampicillin	Sigma Aldrich GmbH
Heparin Sodium Salt	Sigma Aldrich GmbH
Penicillin / Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH
Ascorbat	Sigma Aldrich GmbH
Lipofectamin TM 2000	Life Technologies GmbH
E2	Sigma Aldrich GmbH
ICI 182-870	Sigma Aldrich GmbH
Bacto-Agar	Merck
Bacto-Trypton	Roth
Bacto-Yeast-Extract	AppliChem
IPTG (1-Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid)	Sigma Aldrich GmbH
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid)	Sigma Aldrich GmbH
G418	Life Technologies GmbH

2.4 Kits

Kit	Hersteller
Big Dye Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega GmbH
Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega GmbH
Nucleo Spin® RNA II	Macherey-Nagel

Material und Methoden

Nucleo Spin® Plasmid	Macherey-Nagel
Nucleo Bond® PC 500	Macherey-Nagel
Nucleo Trap®	Macherey-Nagel
Luciferase Assay System	Promega GmbH
RotiQuant Protein Assay	Carl Roth GmbH + Co. KG
Mutagenese- Kit, "Quick Change XL Site- Directed Mutagenesis"	Agilent Technologies GmbH
TA Cloning Kit Dual Promoter (pCR® II Vektor)	Life Technologies GmbH

2.5 Primer

2.5.1 Primer zum Nachweis und zur Amplifikation der cDNA

Genname	Sense Primer (5`-3`)	Antisense Primer (5`-3`)	Produktgröße bp
IGF-1	TGG ATG CTC TTC AGT TCG TG	CTG ACT TGG CAG GCT TGA G	177
EF1α	AGG TGA TTA TCC TGA ACC AT CC	AAA GGT GGA TAG TCT GAC TGT TG	233
ERα	GCA AGA ACT CAG GAC GGT G	GGA CAG CCG GAA CAG AGC	101
HB-GAM	GCA AAC CAT GAA GAC CCA GA	GGC TTG GAG ATG GTG ACA GT	188
ERβ sense	CGG TGT GTT TAT CTG CAA GCC	GAC ATT GCT GGG AAT GCT GTA	294
ERβ expr. fwd	CAA GGC CGG TGT GTT TAT CT	AGG GAC CAC ACA GCA GAA AG	1808
ERβ 280508	CAA CAC CTG GGC ACC TTT CT	CCA ACT TGG TCA GGG ACA TCA	662

2.5.2 Primer zur Sequenzierung

Primer	DNA-Sequenz (5`-3`)	Schmelzpunkt (°C)
T 7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	56

2.5.3 Primer zur Mutagenese

Punktmutationsprimer	
Primer	Sequenz
ER α g3041c s	AGC CCA GCG GCT ACA CGG TGC GCG
ER α g3041c as	CGC GCA CCG TGT AGC CGC TGG GCT
ER α t3493c s	TGA GAG CTG CCA ACC TTT GGC CAA GCC CG
ER α t3493c as	CGG GCT TGG CCA AAG GTT GGC AGC TCT CA
ER α c4262a s	TGC TGG ACG CCC ACC GCC TAC ATG C
ER α c4262a as	GCA TGT AGG CGG TGG GCG TCC AGC A
ER α g3041c s	AGC CCA GCG GCT ACA GGT GCG CG

2.5.4 Primer zur lentiviralen Überexpression

Primer	Sequenz
ZP1 s+as	TTC GGC TCC AAC GGC CTG
ZP2 s+as	AGT ATT CAA GGA CAT AAC GAC T
ZP3 s+as	CGA GTA TGA TCC TAC CAG AC
ZP4 s+as	CAG CAC CCT GAA GTC TCT CTG

2.6 Antikörper Immunzytologie

Primärantikörper	ER α (F-10) (sc-8002, mouse monoclonal, Santa Cruz)	1:200 Verdünnung
Sekundärantikörper	Anti-mouse-IgG donkey NL557 PE 0,5ml NL007 R&D systems	1:400 Verdünnung

2.7 Zellen

HEK 293	Human embryonic kidney cell line 293, ATCC Nr. CRL-1573 (Humane embryonale Nierenzellen)
MSC	Primäre mesenchymale Stammzellen (MSC-Isolation aus Hüftköpfen)

hMSC-TERT	Telomerase-immortalisierte humane mesenchymale Stammzellen (Simonsen et al.2002)
-----------	--

2.8 Bakterien

Die angegebenen Bakterienstämme wurden zur Transformation eingesetzt.

<i>E. coli</i> , DH5 α (New England Biolabs)	F- ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_k⁻, m_k⁺</i>) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i> (Genotyp)
<i>E.coli</i> , XL 10 Gold (Agilent Technologies GmbH)	

2.9 Vektoren

pCR [®] II Vektor (4000 bp)	Klonierungsvektor	Life Technologies GmbH
pBluescriptR (2998 bp)	Expressionsvektor	Life Technologies GmbH
pcDNA3.1 (+/-) (5428/5427 bp)	Expressionsvektor	Life Technologies GmbH
pGL4.14[luc2/Hygro]	Luciferase Reporter Vektor	Promega GmbH

2.10 Enzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs GmbH bezogen. Es wurden die vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen befolgt.

DNase A	Macherey-Nagel
RNase A	Macherey-Nagel
M-MLV-Reverse Transkriptase (200 U/ μ l)	Promega GmbH
T4-DNA-Ligase (3U/ μ l)	Promega GmbH
<i>Taq</i> -Polymerase (5U/ μ l)	Peqlab Biotechnologie GmbH

2.11 Größenmarker

1 kb DNA-Leiter	Peqlab Biotechnologie GmbH
100 bp DNA Leiter	Peqlab Biotechnologie GmbH
6 x Ladepuffer	Peqlab Biotechnologie GmbH

2.12 Lösungen

Je nach benötigter Reinheit wurden Lösungen mit deionisiertem Wasser, doppelt destilliertem deionisiertem Wasser (Aqua bidest) oder mit HPLC-Wasser angesetzt.

DNA Ladepuffer blau	
25 ml	Glycerol
100 µl	0,5 M EDTA
125 mg	Xylencyanolblau
125 mg	Bromphenolblau
ad 50 ml	Aqua bidest

DNA Marker	
10 µl	DNA-Leiter (1 kb, 100 bp)
10 µl	Ladepuffer
ad 100 µl	HPLC-H ₂ O

10x TBE Puffer	
108 g	Tris
55 g	Borsäure
40 ml	EDTA (pH 8,0)
ad 1 l	Aqua bidest

PBS	
8 g	NaCl
0,2 g	KCl
1,44 g	Na ₂ HPO ₄

Material und Methoden

0,2 g	KH ₂ PO ₄
ad 1 l	Aqua bidest
ad pH 7,4	HCl

2.13 Nährmedien und Zusätze für die Gewebekultur

Medium für HEK 293 Zellen	
DMEM High Glucose (4,5 g/l)	500 ml
FCS	50 ml
Glutamin (100x)	5 ml
Pyruvat	(1 mM)

Medium für MSC	
DMEM / HAM's F12 (with Glutamine)	500 ml
FCS	50 ml
Penicillin / Streptomycin (100x)	5 ml
Ascorbat	(1 mM)

Medium für hMSC-TERT	
Earle's MEM	500 ml
FCS	50 ml
Hygromycin	50 µg/ml

2.14 Nährmedien und Zusätze für die Bakterienkultur

LB Medium	
16 g	Bacto-Trypton
8 g	Bacto-Yeast-Extract
16 g	NaCl
ad 1600 ml	Aqua bidest
ad pH 7,0	NaOH

Material und Methoden

Außerdem wurde für Festmedium 16 g/l Bacto-Agar dazugegeben und Selektionsmedium wurde mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt. Fest- und Flüssigmedium wurden autoklaviert.

SOC Medium	
20 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt
0,5 g	NaCl
10 ml	0,25 M KCl
5 ml	2 M MgCl ₂
20 ml	1 M Glucose
ad 1 l	Aqua bidest
ad pH 7,0	NaOH

NZY+ Medium	
NZ Amine (Casein Hydrolysat)	10 g
Yeast Extrakt	5 g
NaCl	5 g
➤ Mit deionisiertem Wasser auf 1 l auffüllen, pH mit NaOH auf 7,5 einstellen und autoklavieren. Dann steril hinzugeben:	
1 M MgCl ₂ (sterilfiltriert)	12,5 ml
1 M MgSO ₄ (sterilfiltriert)	12,5 ml
20% Glucose (sterilfiltriert)	20 ml

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Alle Arbeiten, die im Folgenden erläutert werden, wurden in der Zellkultur an einer Sterilbank mit sterilen Materialien durchgeführt. Hierbei wurden Handschuhe getragen.

3.1.1 Kultivierung von Zellen

Die eingesetzten Zelllinien (HEK293, hMSC-TERT, Cos 7) wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden alle 4 Tage mit frischem Medium versorgt. Für die unterschiedlichen Zellarten wurden spezielle Medien verwendet, wie unter 2.13 aufgeführt. Sobald die Zellen 95-100%ige (HEK293) bzw. 80-100%ige (hMSC-TERT, Cos-7) Konfluenz erreicht hatten, wurden sie passagiert. Das entsprechende Medium wurde vor Beginn des Mediumwechsels im Wasserbad auf 37°C erwärmt, um die Zellen nicht unnötig zu strapazieren. Das verbrauchte Medium wurde von den Zellen abgenommen und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden 1 ml (HEK293) bzw. 1.5-2 ml (hMSC-TERT) bzw. 2,5 ml (Cos-7) Trypsin/EDTA (0,5 g/l) auf Zellen einer 75 cm² großen Zellkulturflasche gegeben und für kurze Zeit im Brutschrank inkubiert. Nach vollständiger Ablösung der am Boden haftenden Zellen wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 5 ml Kulturmedium beendet. HEK293-Zellen wurden im Verhältnis 1:6 passagiert, d.h. es wurde 1 ml der HEK293-Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche (75 cm²) mit vorgelegtem Medium gegeben. Bei Bedarf wurde der Rest der HEK293-Zellsuspension bei 1200 rpm für 5 min abzentrifugiert und für weitere Experimente verwendet. Um die hMSC-TERT-Zellen vor zusätzlichem Stress zu schützen, wurden das Trypsin nach Abstoppen der enzymatischen Reaktion abzentrifugiert (5 min, 1200 rpm). Danach wurden die Zellen in frisches Medium aufgenommen und im Verhältnis 1:4 gesplittet bzw. nach Bestimmung der Zellzahl für weitere Versuche eingesetzt. Den Cos-7-Zellen wurden nach Inkubation 10 ml DMEM versetzt, 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin hinzugefügt und 2 ml dieser Zellsuspension in 10 ml frisches Medium einer 75-cm²-Kulturflasche gegeben.

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Im Rahmen vieler Experimente ist die Kenntnis der genauen Zellzahl notwendig. Dafür wurden, wie unter 3.1.1 beschrieben, die Zellen zuerst vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Daraufhin wurden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau vermischt und in eine Neubauerkammer pipettiert. Da die Zählfläche der Zählkammer in 4 x 4 Quadrate aufgeteilt ist, wurden die lebenden Zellen folglich innerhalb dieser 4 Quadrate gezählt. Um zu erfahren, wie hoch die Zellzahl in 1 ml ist, wurde die Anzahl der gezählten Zellen mit einem Verdünnungsfaktor von 2 und 10³ multipliziert.

3.2 Gewinnung von cDNA aus humanen Zellen

3.2.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation aus hMSC-TERT und HEK293-Zellen erfolgte mit dem NucleoSpin® RNA II Kit von Macherey-Nagel. Der erste Schritt war hierbei die Lyse der Zellen mit 350 µl RA1 Puffer und 3,5 µl β-Mercaptoethanol. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die so lysierten Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abgekratzt und in ein RNase-freies Reaktionsgefäß überführt. Das Zell-Lysat wurde anschließend über einen NucleoSpin® Filter 1 min lang bei 11000 x g abzentrifugiert. Das homogenisierte Zell-Lysat wurde mit 350 µl 70%igem Ethanol gemischt und auf eine im Kit enthaltene NucleoSpin® RNA II Säule pipettiert. Hierauf folgte die Zentrifugation 30 sec lang bei 11000 x g. Um das Salz von der Membran zu entfernen und die Effektivität des folgenden rDNase-Verdau zu erhöhen, wurden im nächsten Schritt 350 µl MDB (Membrane Desalting Buffer) auf die Membran der Säule gegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt (11000 x g, 1 min), der zur Trocknung der Membran diente, wurde 95 µl des frisch hergestellten rDNase-Mix auf die Säule gegeben. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µl Stopplösung (RA2 Puffer) beendet. Dann wurde die Membran zweimal mit RA3 Waschpuffer gewaschen. Die Trocknung der Membran erfolgte durch Zentrifugieren bei 11000 x g für 2 min. Anschließend wurde die RNA mit 60 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Zum Schutz vor RNAsen wurden während der Arbeit stets Handschuhe getragen und nur sterile Plastikgefäße und Pipetten verwendet.

3.2.2 cDNA-Synthese durch Reverse Transkriptase (RT)

Bei der cDNA-Synthese wird RNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT; virales Enzym) zu einzelsträngiger (ss) cDNA umgeschrieben. Für die cDNA-Synthese wurde die bei der RNA-Isolation aus den Zellen extrahierte RNA verwendet. Für einen RT-Reaktionsansatz wurden 2 µg der Gesamt-RNA auf 16 µl HPLC-Wasser aufgefüllt und mit Oligo-dT-Primern (50 pmol/µl) vermischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei 70°C zum Denaturieren der RNA-Sekundärstrukturen erfolgte die Abkühlung des Reaktionsansatzes auf Eis. Anschließend wurde der RT-Reaktions-Mix bestehend aus M-MLV RT-Puffer, 20 mM dNTP-Mix, HPLC-Wasser und M-MLV-RT (200 U/µl) zu dem Reaktionsansatz (Endvolumen 25 µl) pipettiert und 1 h bei 42°C inkubiert. Danach wurde

der Reaktionsansatz für 10 min auf 94°C erhitzt, um die Reaktion abzustoppen. Die so synthetisierte cDNA konnte nun als DNA in einer PCR eingesetzt werden.

3.3 Amplifizierung, Analyse und Aufreinigung spezifischer Sequenzen

3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Möglichkeit, spezifische DNA- Sequenzen zu vervielfältigen und nachzuweisen. Da die DNA in der Regel doppelsträngig vorliegt, startet die PCR, indem die DNA zu Beginn des Prozesses durch Erhitzen auf 94°C in Einzelstränge getrennt wird. Beim darauffolgenden Abkühlen auf die spezifische Annealing-Temperatur binden die Primer (Oligonukleotide) an die komplementären Einzelstränge und dienen als Starter für die PCR. Die thermostabile DNA-Polymerase ist letztendlich dafür verantwortlich, dass die Einzelstränge in 5`→3`-Richtung entlang der einzelnen Matrizenstränge verdoppelt werden. Der so gebildete Doppelstrang wird durch wiederholte Erhöhung der Temperatur auf 94°C wieder getrennt – die Bindungsstellen der Primer werden wieder frei und der Zyklus kann nach dem Absinken der Temperatur von neuem ablaufen. Durch frequentes Wiederholen dieses Ablaufs erreicht man eine exponentielle Vermehrung der DNA. Als DNA kann bei der PCR beispielsweise Plasmid-DNA, genomische DNA oder cDNA eingesetzt werden. Die Standard-PCR wurde gewöhnlich nach folgendem Muster in einem Reaktionsvolumen von 50 µl (49 µl Mix und 1 µl cDNA) angesetzt.

Reagenzien	Volumen in µl
10 x PCR-Puffer	5
dNTP-Mix 20 mM	1
MgCl ₂ 25 mM	0 bis 4
Sense Primer 25 pmol/µl	1
Antisense Primer 25 pmol/µl	1
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,25
HPLC-H ₂ O	ad 49

Tabelle 2 Grundschemata einer Standard-PCR

Material und Methoden

Als Negativkontrolle wurde bei jeder PCR in einer Probe HPLC-Wasser anstelle von cDNA pipettiert.

Eine Möglichkeit, die Ausbeute der PCR zu verbessern, besteht in der Beeinflussung der Bedingungen einer PCR-Reaktion auf unterschiedliche Weise. So konnte man z.B. über die Zugabe von DMSO oder eine Veränderung der Mg^{2+} -Konzentration die Effektivität der Reaktion steigern. Auch die Annealing-Temperatur spielte eine wichtige Rolle und wurde nach ihrer Schmelztemperatur T_M bestimmt. Zur Bestimmung der Schmelztemperatur T_M wurde die Formel $T_M = 4^\circ C(G+C) + 2^\circ C(A+T)$ verwendet. Die Annealing-Temperatur der Primer wurde in der Regel $2^\circ C$ unter der berechneten Schmelztemperatur T_M gewählt. Die Reaktionsparameter (Annealing-Temperatur, Elongationszeit, Zyklenzahl) wurden an die jeweiligen Bedingungen angepasst.

	Temperatur (°C)	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94	4 min	1
Denaturierung	94	30 sec	27-40
Annealing	50-62	30 sec	
Elongation	72	30-110 sec	
Terminale Verlängerung	72	7 min	1
Kühlung	12	∞	

Tabelle 3 Programm einer Standard-PCR

Genname	PCR-Produkt in bp	T_A in °C	Anzahl der Zyklen	Konzentration $MgCl_2$ in mM
EF-1- α	233	54	30	1,5
IGF-1	177	58	38	1,0
ER α	101	60	40	0,0
ER β	1400-1800	62	40	2,0

Tabelle 4 Genspezifische Bedingungen für die PCR

Die Analyse des entstandenen PCR-Produkts wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

3.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese war es möglich, Nukleinsäure-Proben zu analysieren. Durch die poröse Struktur des Agarosegels werden Nukleinsäuren nach ihrer Größe aufgetrennt. Die negativ geladenen Nukleinsäuren wandern im elektrischen Feld (10 V/cm) von der Kathode in Richtung Anode. Dabei bewegen sich kleine Nukleinsäure-Moleküle leichter und schneller als große Fragmente durch die siebartige Struktur des Agarosegels.

Es wurden ausschließlich 1%ige Agarosegele verwendet, d.h. 0,5 g Agarose wurden in 50 ml 0,5 x TBE-Puffer gelöst und aufgeköcht (5 min, 400 W). Nach einer Abkühlungsphase auf ungefähr 60°C wurden der flüssigen Agarose-Mischung Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zugegeben und in einen vorbereiteten Gelschlitten gegossen. Die Elektrophoresekammer wurde soweit mit 0,5 x TBE-Puffer aufgefüllt, bis das erkaltete Gel gut bedeckt war. Es wurden 10 µl des PCR-Produktes mit 2 µl 5 x Probenpuffer vermischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Zur Größenbestimmung der Nukleinsäure-Fragmente wurde gleichzeitig ein geeigneter Größenmarker aufgetragen. Die DNA-Fragmente bewegten sich im elektrischen Feld bei 80 bis 100 V und 150 mA. Das dem Gel zugegebene Ethidiumbromid interkaliert in die DNA-Doppelhelix und macht durch seine Fluoreszenz unter UV-Licht (254 nm) die aufgetrennten DNA-Fragmente sichtbar.

3.3.3 Extraktion von DNA-Fragmenten

Nach der Gelelektrophorese wurden die DNA-Banden von Interesse unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Im nächsten Schritt wurden die ausgeschnittenen Gelstückchen gewogen, um die benötigte Menge des Lysis-Puffers NT1 zu berechnen (300 µl NT1 pro 100 mg Agarose). Zur weiteren DNA-Extraktion aus den Gelstückchen wurde der NucleoTrap® Kit von Macherey-Nagel unter Befolgung der Herstellerangaben. In einem abschließenden Schritt wurde die DNA mit 50 µl NE-Puffer aus der Silica-Matrix eluiert. Die Konzentrationsbestimmung der eluierten ds DNA erfolgte am Photometer.

3.4 Klonierung von DNA-Fragmenten

Als Klonieren bezeichnet man ein Verfahren, bei dem spezifische DNA-Fragmente isoliert in Vektoren wie beispielsweise Plasmide eingeführt werden. Die dabei entstehenden rekombinanten Trägermoleküle werden in einen Wirtsorganismus (z.B. *E. coli*) inseriert und mit seiner Zellteilung vermehrt. Auf diese Weise können große Mengen des gewünschten DNA-Fragments gewonnen und nach anschließender Isolation weiterverarbeitet werden.

3.4.1 Gewinnung von DNA-Fragmenten

Bei der Produktion rekombinanter DNA ist es erforderlich, mit genau definierten DNA-Fragmenten zu arbeiten. Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wurde die DNA an ihren Restriktionsschnittstellen (Erkennungssequenzen aus 4-8 bp) erkannt und in exakt festgelegte Stücke (DNA-Fragmente) geschnitten. Der passende Puffer für die Verdaureaktionen wurde anhand der Enzymaktivitätsliste des Herstellers ausgewählt. Für je 10 µg Plasmid-DNA wurden 5-10 U Enzym eingesetzt. Der Restriktionsverdau erfolgte über einen Zeitraum von zwei Stunden bei dem Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms (in der Regel bei 37°C). Die DNA wurde auch durch den gleichzeitigen Verdau mit zwei Restriktionsenzymen analysiert. Dafür war es nötig, dass ein Puffer gefunden wurde, in dem beide Enzyme eine ausreichend hohe Aktivität besaßen. Das Resultat des Verdau auf Vollständigkeit wurde überprüft, indem der Restriktionsansatz mit 5 x DNA-Probenpuffer gemischt wurde und zusammen mit einem DNA-Marker auf einem Agarosegel aufgetrennt wurde.

3.4.2 Ligation von DNA-Fragment und Vektor

Ein DNA-Fragment und ein linearisiertes Plasmid können sich durch Basenpaarung aneinanderlagern und werden durch eine DNA-Ligase verknüpft. Die DNA-Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer freien OH-Gruppe am 3`-Ende der einen DNA-Kette und einer Phosphatgruppe am 5`-Ende der anderen DNA-Kette (Ligation).

Für den Ligationsansatz wurden 100 ng des zu klonierenden DNA-Fragmentes, 50 ng Plasmid-DNA, 1 µl 10 x Ligations-Puffer sowie 1 U T4-DNA-Ligase (Promega GmbH) in einem Reaktionsvolumen von 10 µl gemischt. Dieser Ligationsansatz wurde über

Nacht bei 14°C inkubiert und anschließend zur Transformation von Bakterien verwendet.

Der ER α wurde zunächst mit dem TA Cloning Kit von Life Technologies GmbH in den pCR® II Klonierungsvektor und anschließend in den pcDNA3.1 Expressionsvektor kloniert.

3.4.3 Klonierung der Konstrukte und Etablierung von stabilen hMSC-TERT-Zelllinien i.R. von Dehnungsversuchen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mechanoresponsive Luciferase-Reportergenkonstrukte kloniert, die es ermöglichen sollten zu untersuchen, ob Zellen auf Dehnung mit einer zellulären Antwort reagieren.

Von Interesse war hierbei, ob mechanische Stimulation Auswirkungen auf unterschiedliche Reporter gene hat. Hierzu wurden in der Arbeitsgruppe fünf verschiedene Elemente (AP1, SP1, ERE, SSRE-ERE bzw. SP1-SSRE, siehe Tab. 5) zwischen die EcoRI Sites des pCRII Vektors kloniert.

Responsives Element	Sequenz 5´-3´
ERE	ATC AGG TCA CAG TGA CCT CAT GCA TGA GGT CAC AGT GAC CTC TA
SP-1	ATC GCG GCG GGG GCGGGC GCC GCA TGC ATG GCG GCG GGG GCGGGC GCC GCT A
AP1	ATC TGA CTC AGC ATG CAT GTG ACT CAG CTA
ERE + SSRE	ATC AGG TCA CAG TGA CCT CAT GCA TGG AGA CCC ATG CAT GAG GTC ACA GTG ACC TCA TGC ATG GAG ACC CTA
SP1 + SSRE	ATC GCG GCG GGG GCG GGC GCC GCA TGC ATG GAG ACC CAT GCA TGG CGG CGG GGG CGG GCG CCG CAT GCA TGG AGA CCC TA
AP1 + SSRE	ATC TGA CTC AGC ATG CAT GGA GAC CCA TGC ATG TGA CTC AGC ATG CAT GGA GAC CCT A

Tabelle 5 Sequenzen der responsiven Elemente

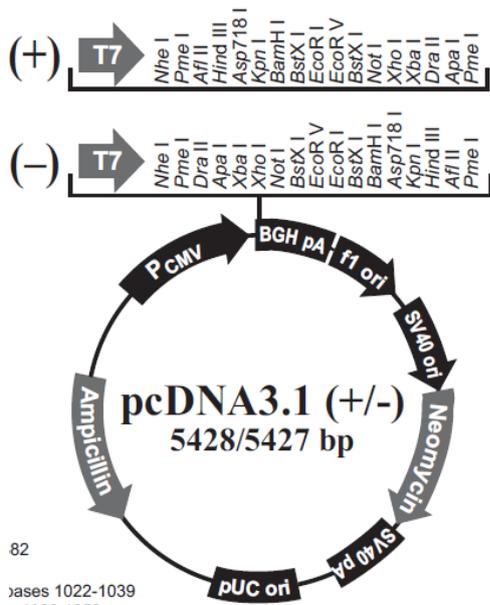


Abbildung 7 Der pcDNA3.1 (+/-) Vektor (www.lifetechnologies.com). (Mit freundlicher Genehmigung von Life Technologies).

Das AP1-Element wurde mithilfe von XhoI und BamHI, das SP1 Element mithilfe von SacI und XhoI Restriktion in den Luciferasereporter Vektor pGL4.14 [luc2/Hygro] kloniert.

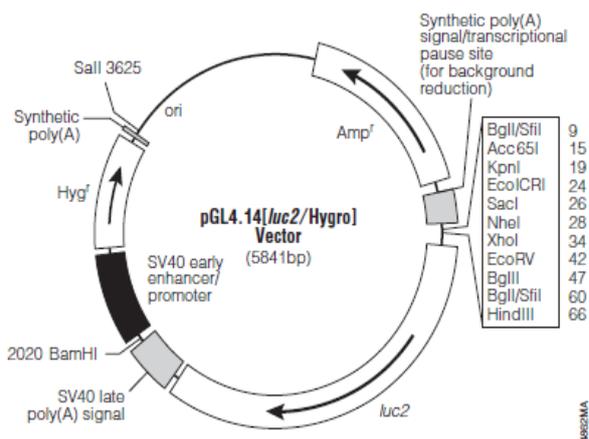


Abbildung 8 Der pGL4.14 (luc2/Hygro) Vektor (www.promega.com). (Abbildung mit Genehmigung der Promega Corporation veröffentlicht).

Der pGL4.14[luc2/Hygro] Vektor codiert das Luciferase-Reporter gen *luc2* (*Photinus pyralis*) und wurde entworfen, um eine hohe Genexpression sowie eine abweichende

Transkription zu ermöglichen. Des Weiteren enthält dieser Vektor einen Marker für eine Hygromycinresistenz, wodurch es möglich ist, stabile Zellen zu generieren. Der Vektor enthält multiple Klonierungssequenzen, um das Klonen des gewünschten Promotors zu ermöglichen.

3.4.4 Transformation bakterieller Wirte mit rekombinanter DNA

Eine Portion (50 µl) kompetenter Zellen E. coli DH5α wurde auf Eis aufgetaut, mit 2 µl des Ligationsansatzes versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 20 sec wurden die Zellen auf Eis abgekühlt. Daraufhin wurde dem Transformationsansatz 250 µl SOC-Medium zugegeben und der gesamte Ansatz 1 h bei 37°C und 750 rpm geschüttelt. Anschließend wurden 50 µl und die restlichen 250 µl des Transformationsansatzes auf Ampicillin/LB-Agarplatten verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Manche Vektoren (pCRII) lassen eine Blau-Weiß-Selektion zu. Dies wurde dadurch berücksichtigt, dass vor dem Ausplattieren des Transformationsansatzes 40 µl X-Gal (50 mg/ml) sowie 10 µl IPTG (200 mg/ml) auf den Ampicillin/LB-Agarplatten verteilt wurden. Am nächsten Morgen wurden die weißen, rekombinanten Klone gepickt, in 2 ml Ampicillin/LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag konnte aus der Übernachtskultur die Plasmid-DNA isoliert werden.

3.5 Präparation von Plasmid-DNA

3.5.1 Plasmid-Mini-Präparation

Eine Plasmid-Mini-Präparation wurde mithilfe des NucleoSpin® Plasmid Kits von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Im ersten Schritt wurde 1 ml einer Übernachtskultur für 30 sec bei 11000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl Puffer A1 resuspendiert und durch Vortexen kräftig gemischt. Weitere 250 µl Puffer A2 wurden zu der Mischung gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 300 µl Puffer A3 zu dem Reaktionsgemisch pipettiert und vorsichtig gemischt. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 bis 10 min, 11000 x g, Raumtemperatur) wurde der entstandene Überstand auf eine NucleoSpin® Plasmid Säule geladen und 1 min bei 11000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 600 µl Puffer A4 gewaschen und 1 min bei 11000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die Membran der Säule erneut bei 11000 x g für 2 min zentrifugiert,

um sie vollständig zu trocknen. In einem abschließenden Schritt wurde 50 µl AE Puffer auf die NucleoSpin® Plasmid Säule gegeben, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und die DNA durch Zentrifugieren (11000 x g, 1 min) eluiert.

3.5.2 Plasmid-Maxi-Präparation

Die Maxipräparation wurde eingesetzt, um gewünschte Plasmid-DNA im größeren Maßstab aus den entsprechend transformierten E. coli NEB 5α zu gewinnen. Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des NucleoBond® PC 500 Kits von Macherey-Nagel durchgeführt.

Dazu wurde eine Übernachtskultur von 200 ml LB-Medium mit 200 µl Ampicillin nacheinander auf zwei 50 ml Röhrchen verteilt und bei 4°C und 3200 x g 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde zunächst in 12 ml Puffer S1 mit RNase A resuspendiert und nach Zugabe von 12 ml Puffer S2 2 bis 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 12 ml Puffer S3 zu der Suspension hinzugefügt und 5 min auf Eis inkubiert. Im folgenden Schritt wurde die NucleoBond® AX 500 Säule mit 6 ml Puffer N2 äquilibriert. Daraufhin wurde das Bakterien-Lysat über einen NucleoBond® Filter gefiltert, die NucleoBond® Säule mit 32 ml Puffer N3 gewaschen und die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer N5 eluiert. Die Zugabe von 11 ml Isopropanol führte zur Fällung der eluierten Plasmid-DNA. Nach einem Zentrifugationsschritt (15000 x g, 30 min, 4°C) wurde das entstandene Pellet mit 70% Ethanol versetzt und 10 min bei 15000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig vom Pellet abgenommen und verworfen, so dass das Pellet 10 bis 20 min bei Raumtemperatur trocknen konnte. Das getrocknete DNA-Pellet wurde in 100 µl HPLC-Wasser gelöst und die Konzentration der DNA wurde am Photometer gemessen.

3.5.3 Photometrische Analysen

Die Konzentration von Nukleinsäure-Lösungen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Dafür wurden die Proben 1:50 verdünnt, indem 1 µl der Probe zu 49 µl HPLC-Wasser gegeben wurde. Für die Bestimmung des Nullabgleichs wurde HPLC-Wasser verwendet. Die Reinheit der Probe ist optimal, wenn die Nukleinsäure-Lösung ein Verhältnis der Absorption (OD_{260}/OD_{280}) von 1,8-2,0 aufweist.

3.6 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wird verwendet, um die Abfolge der Nukleotidsequenz in einem festgelegten DNA-Bereich zu bestimmen. Das folgende Sequenzierungs-Protokoll wurde explizit für den Gebrauch eines ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer von Applied Biosystems konzipiert.

Die Sequenz-Analyse basierte auf der Zugabe von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden während der PCR (Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing von Applied Biosystems). Dadurch wurde eine Markierung der DNA mit Fluoreszenzfarbstoffen erzielt, die vom Sequenzer während der Elektrophorese mit Hilfe eines Lasers angeregt und ermittelt wurde. Die für diese Reaktionen benötigten Chemikalien waren im Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit enthalten. Der Master-Mix für die Sequenzierungs-PCR bestand aus 4 µl Big Dye Terminator v1.1 Ready Reaction Mix (2,5x) (umfasst Fluoreszenz-Didesoxynukleotide, Desoxynukleotide und AmpliTaq DNA-Polymerase), 2 µl Big Dye Sequencing v1.1/3.1 Puffer (5 x) und 5 pmol Primer. Es wurden 500 ng DNA eingesetzt, und das Reaktionsvolumen betrug 20 µl. Die Durchführung des Cycle Sequencing erfolgte in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94	4 min	
Denaturierung	94	30 sec	25
Annealing	50	1 min	
Elongation	60	1 min	
Terminale Verlängerung	72	5 min	
Kühlung	12	∞	

Tabelle 6 Bedingungen der Sequenzierungs-PCR

Nach Abschluss der Sequenzierungs-PCR wurde das PCR-Produkt über eine NucleoSEQ-Säule von Macherey-Nagel gereinigt. Das dabei entstandene Eluat wurde mit 3 µl 3 M Na-Acetat (pH 4,3) sowie 80 µl 100%igem Ethanol versetzt. Nach einer

Material und Methoden

Inkubationsdauer von 15 min bei Raumtemperatur wurde diese Mischung 20 min bei 13000 U/min zentrifugiert, anschließend mit 250 µl 70%-igem Ethanol versehen und zweimal für 15 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes konnte das Pellet trocknen. Das Pellet wurde in 15 µl TSR-Reagenz (Applied Biosystems) gelöst und die Suspension in ein Sequenzierungsreaktionsgefäß gegeben. Nach der Denaturierung in einem Thermocycler (94°C, 4 min) wurden die Proben in den Sequenzer gestellt und das Sequenzierungs-Programm gestartet.

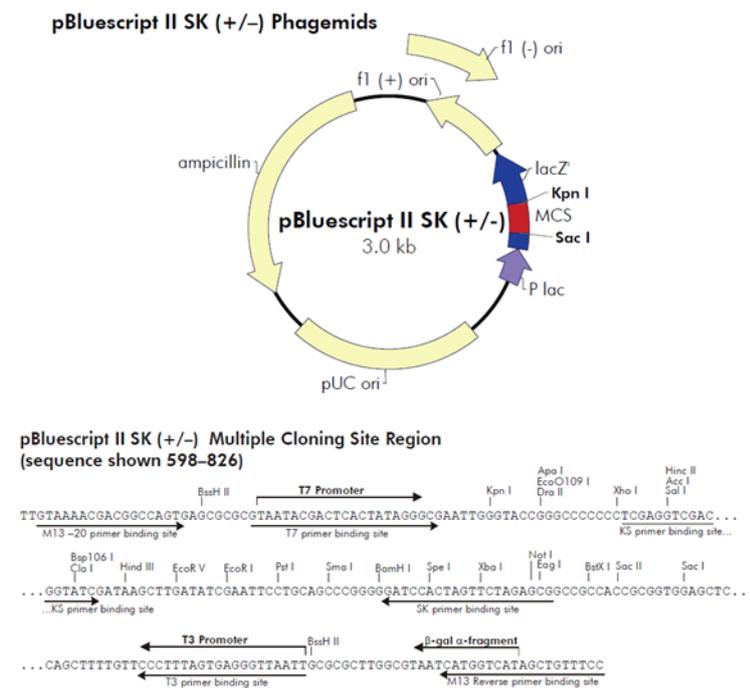


Abbildung 9 Der pBluescript SK II Vektor (www.genomics.agilent.com/home-page.aspx). (Mit freundlicher Genehmigung von Agilent).

3.7 Mutagenese

Zur Vermeidung fehlerhafter ER α -Konstrukte wurde zunächst vor Herstellung einer stabilen Zelllinie eine Mutagenese durchgeführt.

Als Vorbereitung für die Mutagenese wurde zunächst das Plasmid pcDNA3.1- ER α vollständig sequenziert, eine Maxipräparation des Plasmids durchgeführt und das Plasmid so verdünnt, dass eine Konzentration von 5 ng/µg erreicht wurde. Daraufhin wurden die Mutagenese-Oligonukleotide vorbereitet, sodass eine Verdünnung von 1:10 hergestellt war.

Material und Methoden

Für die in-vitro-Mutagenese wurde ein Ansatz unter Verwendung des QuikChange Mutagenesis Kits (Agilent Technologies) hergestellt mit 2 µl Plasmid (pcDNA 3.1- ERα), 5 µl 10x Puffer, 1,25 µl sense Primer, 1,25 µl antisense Primer, 1 µl dNTP, 3 µl Quick-Solution, 35,5 µl H₂O und 1 µl Pfu Ultra Polymerase. Daraufhin wurde die Mutagenese im PCR-Block, wie unter Tab. 8 beschrieben, durchgeführt.

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
95°C	1 Min.	
95°C	50 sec	
60°C	50 sec > 18 Zyklen	18
68°C	7 Min.	
68°C	7 Min.	

Tabelle 7 Programm der Mutagenese

Nach Beendigung der Mutagenese wurden die Proben zunächst 2 Minuten auf Eis abgekühlt, dann wurde 1 µl DpnI Restriktionsenzym hinzugegeben, welches die ursprüngliche, methylierte DNA verdaut und somit entfernt, dieser Ansatz für eine Minute zentrifugiert und schließlich 1 h bei 37°C inkubiert.

Für die darauffolgende Transformation wurden zunächst 45 µl E. coli XL 10 GOLD auf Eis aufgetaut. Daraufhin wurden 2 µl βME-Mix zugegeben und mit der Pipettenspitze gemischt. Dann wurde dieser Mix 10 Minuten auf Eis inkubiert und dabei alle 2 Minuten gemischt. Nun wurden 5 µl des Mutagenese-Ansatzes durch Transformation in die Bakterien eingebracht, 500 µl des auf 42°C vorgewärmten NZY+ Mediums wurden zugegeben und der Ansatz 1 h bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Nun wurden drei LB-Amp. Platten vorbereitet und auf die drei verschiedenen Platten je 50, 100 und 400 µl des vorbereiteten Ansatzes ausplattiert. Diese wurden über Nacht im Bakterienbrutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden 10 einzelne Kolonien gepickt und in 3 ml NZY+ Medium+ Amp. über Nacht inkubiert. Aus diesem Material wurde die Plasmid-DNA isoliert und die Klone vollständig sequenziert.

3.8 Herstellung stabiler transfizierter Zellen mittels Elektroporation

Die Herstellung stabiler transfizierter Zellen dient dazu, Zellen herzustellen, die über die gewünschten spezifischen DNA-Sequenzen verfügen. Dies ist von Interesse, wenn untersucht werden soll, ob die Genexpression von Interesse auf bestimmte steuerbare Einflüsse reagiert.

3.8.1 Definition der Elektroporation

Das Prinzip der Elektroporation besteht darin, dass ein sich entladender Kondensator kurze elektrische Impulse abgibt und ein elektrisches Feld erzeugt. Dadurch werden in der Zellmembran kurzfristig sehr kleine Löcher gebildet, durch welche Fremd-DNA aus der Lösung in die Zelle diffundieren können. Diese Methode der Transfektion wird als Elektroporation bezeichnet.

3.8.2 Durchführung der Elektroporation („Einbringen von DNA in Zellen“)

Nach Ablösung der hMSC-TERT-Zellen mittels Trypsin wurden die Zellen in Medium ohne FCS und ohne Penicillin und Streptomycin resuspendiert und gezählt. Daraufhin wurden 10 µg linearisierte Plasmid-DNA mit einer Million Zellen zusammengebracht und das Volumen mit besagtem Medium auf 350 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde dann in eine Elektroporationsküvette überführt. Daraufhin wurde die Elektroporation bei 95 µF und einer Feldstärke von 0,2 kV durchgeführt. Der Ansatz aus der Elektroporationsküvette wurde dann in ein 15 ml-Röhrchen gefüllt, in dem bereits 5 ml Medium mit FSC und Penicillin und Streptomycin vorgelegt waren. Nach Mischen dieses Ansatzes wurde der Inhalt auf 2 wells einer 6-well Platte verteilt.

Es wurde gewartet bis die Zellen adhärent wurden und nach 3-4 Tagen ein Mediumwechsel durchgeführt. In diesem Medium war Neomycin bzw. G418 (100 mg/ml) enthalten, was dazu führte, dass nur die Zellen überlebten, die über eine Resistenz gegenüber diesen beiden Antibiotika verfügten. Der Nachweis über das Vorhandensein des Genabschnittes erfolgte anschließend über die Durchführung einer PCR und einer Sequenzierung.

3.8.3 Herstellung eines linearisierten Plasmids

Um eine stabile Zelllinie herzustellen, in der sich der Genabschnitt von Interesse befindet, in diesem Fall der ER α , wurde die DNA des ER α in ein Plasmid mit doppelter Resistenz für Ampicillin und Neomycin kloniert. Daraufhin wurde mit Hilfe der Ampicillin-Resistenzen eine Maxi-Präparation zur Isolierung der Plasmid-DNA

durchgeföhrt. 20 µg Plasmid wurden mit SacII linearisiert, einem Restriktionsenzym, das in der Ampicillin-Schnittstelle schneidet. Nach Durchführung des Restriktionsverdau wurde schließlich das linearisierte Plasmid aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert.

3.9 Versuche mit ERα und HEK293-Zellen

3.9.1 Behandlung der ERα-Zellen und ERβ-Zellen mit E2 und ICI 182-870

Es wurde eine stabile Zelllinie verwendet, ERα genannt, die durch Elektroporation von hMSC-TERT-Zellen mit dem ERα entstanden ist. Diese Zellen wurden mit E2 und dem Antiöstrogen ICI 182-870 behandelt. Ziel dieser Versuche war es, durch die unterschiedliche Behandlung die Auswirkungen des Östradiols (E2) und seines Antagonisten auf die ERα-Genexpression der Zellen zu ermitteln. Ermittelt wurden die Konsequenzen der einzelnen Stimulation auf die Expression des ERα anhand von PCRs und dem Auftragen dieser auf ein Agarosegel.

Bei der Behandlung der ERα-Zellen mit E2 und ICI wurden die Zellen im Verhältnis 1:4 auf Zellkulturflaschen (75cm²) in hMSC-TERT-Medium ausgesät. Bei einer Konfluenz der Zellen von 80% wurde den einzelnen Flaschen die entsprechende Konzentration an Stimulationssubstanz evtl. mit entsprechender Konzentration an Antagonist durch vorsichtiges Pipettieren in die Flasche zugefügt und die Zellen anschließend weiter im Brutschrank bei 37°C inkubiert (siehe Tab. 8). Eine Flasche wurde zur Weiterkultivierung der Zelllinie zur Seite gelegt. Bei einer Konfluenz von ca. 90% wurden die Zellen unter Verwendung von Trypsin abgelöst und die RNA wurde extrahiert. Gleiches Vorgehen bezüglich ERβ.

1	Kontrolle
2	E2x10 ⁻⁶ M
3	E2x10 ⁻⁸ M
4	E2x10 ⁻⁶ M+ ICI äquimolar
5	E2x10 ⁻⁸ M+ ICI äquimolar

Tabelle 8 Versuchsaufbau Östradiolbehandlung der ERα-Zellen

3.9.2 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen und Dehnung

Für die transiente Transfektion von HEK293-Zellen wurden HEK293-Zellen in 24-well-Polyurethanschalen ausgesät ($1,8 \times 10^4$ Zellen/well) und bei 50-70% Konfluenz transfiziert. Die Liposom-vermittelte Transfektion wurde mit Lipofectamin 2000 Reagenz durchgeführt. In 100 μ l serumfreies Medium wurden 2 μ l Lipofectamin 2000, 0,9 μ g des pGL4.14-AP1 Reporter Konstruktes und der leere pGL4.14(luc2/Hygro) Vektor gegeben und bei 30 Minuten inkubiert. 124 μ l serumfreies Medium wurde hinzugegeben, und diese Lösung wurde dann vorsichtig auf die Zellen gegeben. HEK-Zellen wurden dann für 5 h in der Transfektionslösung inkubiert. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit serumhaltigem Medium kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen durch zyklisches Dehnen stimuliert (siehe 3.9.8).

3.9.3 Transiente Transfektion und Cotransfektion von HEK293-Zellen mittels Lipofection

HEK293-Zellen wurden mit pGL4.14-ERE oder pGL4.14-ERE+SSRE transfiziert, mit pcDNA3.1⁻, pcDNA3.1⁻-ER α , pcDNA3.1⁻-ER β oder dem Leervektor pcDNA3.1⁻ cotransfiziert und teilweise mit E2 oder E2 plus ICI stimuliert (Versuchsaufbau siehe Abb. 10).

Die HEK293-Zellen wurden in 12-well-Platten ausgesät (4×10^3 Zellen pro well) und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Transfektion mittels Lipofectamin 2000 durchgeführt. Dazu wurden drei Transfektionsmischungen aus je 54 μ l Lipofectamin, 2646 μ l DMEM ohne FCS und 18 μ l Vektor (0,3 μ g/ μ l), je nach Ansatz pcDNA3.1⁻, pcDNA3.1⁻-ER α oder pcDNA3.1⁻-ER β , hergestellt. Dieses Gemisch wurde in 3 Ansätze à 900 ml gesplittet und diesem jeweils 0,9 μ g pGL4.14, pGL4.14-ERE oder pGL4.14-ERE+SSRE hinzugefügt. Nach 30 min Ruhen bei Raumtemperatur wurde zu jedem Ansatz 3900 μ l DMEM ohne FCS pipettiert. In jedes well wurde daraufhin 500 μ l dieser Ansätze nach Schema gegeben.

Nach 5 h wurde das Transfektions-Medium abgesaugt, und stattdessen wurde den Zellen 1 ml neues Medium/well zugefügt, welches je nach Stimulation noch mit E2 oder E2 und äquimolarem ICI erweitert worden war. Daraufhin kamen die Ansätze für 48 h bei 37°C in den Brutschrank.

Material und Methoden

<i>Keine Stimulation</i>	30l DMEM mit 10% FCS
<i>Stimulation mit E2</i>	30l DMEM mit 10% FCS + 30µl E2 (10 ⁻³ M)
<i>Stimulation mit E2&ICI</i>	20l DMEM mit 10% FCS + 30µl E2 (10 ⁻³ M) + 15µl ICI

Tabelle 9 Ansätze für Medium zur Stimulation transfizierter HEK293-Zellen

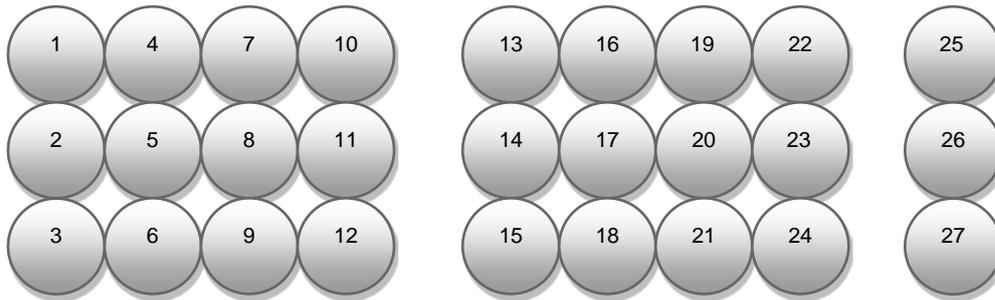


Abbildung 10 HEK293 Transfektion in 12-well Platten: Versuchsaufbau (Erläuterung siehe Tab. 10)

	Ohne Stimulation			Stimulation mit E2 (10 ⁻⁶ M)			Stimulation mit E2 (10 ⁻⁶ M)+ICI		
	pGL	ERE	ERE+ SSRE	pGL	ERE	ERE+ SSRE	pGL	ERE	ERE+ SSRE
<i>pcDNA3.1⁻</i>	1	4	7	10	13	16	19	22	25
<i>ERα</i>	2	5	8	11	14	17	20	23	26
<i>ERβ</i>	3	6	9	12	15	18	21	24	27

Tabelle 10 Versuchsaufbau HEK293

Transfektion mit pGL4.14 (pGL), pGL4.14-ERE (ERE) & pGL4.14-ERE+SSRE (ERE+SSRE), Cotransfektion mit pcDNA3.1⁻, pcDNA3.1⁻-ERα (ERα) & pcDNA3.1⁻-ERβ (ERβ), Stimulation mit E2 und E2+ICI

Der Nachweis des Erfolges der Transfektion beruhte auf dem Nachweis der Luciferaseaktivität. Es sollte untersucht werden, ob eine erhöhte Expression des ERα bzw. ERβ zu einer vermehrten Aktivierung der Luciferase über die responsiven Elemente ERE bzw. ERE-SSRE führen.

3.9.4 Herstellung stabiler Klone

Die Vektoren pGL4.14-ERE, pGL4.14-ERE-SSRE, pGL4.14-AP1, pGL4.14-SP1, pGL4.14-SP1-ERE und pGL4.14(luc2/Hygro) wurden mit SacII linearisiert. 1×10^6 hMSC-TERT-Zellen wurden mit 10 μg DNA in 400 μl serumfreiem Medium vermischt, in 2 mm Küvetten überführt und über Elektroporation bei 120 V und 950 μF unter Benutzung eines GenePulser II transfiziert. Die Zellen wurden in zwei Wells einer 6-Well-Platte gesät und über Nacht in serumhaltigem Medium kultiviert. 24 Stunden nach Transfektion wurden 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hygromycin zur Selektion zugegeben. Für das zyklische Dehnen wurden 3×10^4 Zellen pro Well auf eine 24-Well-Polyurethanschale gegeben und für 48 Stunden kultiviert.

Um die stabile Integration zu kontrollieren, wurde genomische DNA unter Anwendung des QiAamp DNA Mini Kit aus stabilen hMSC-TERT-Zellen nach Angaben des Herstellers isoliert. Die PCR wurde mit 50 ng genomischer DNA in 50 μl durchgeführt.

3.9.5 Lentivirale Überexpression

Primäre Zellen wie hMAC lassen sich nicht ausreichend durch Elektroporation oder Lipofektion transfizieren. Eine effektivere Methode stellt die Transduktion dar, bei welcher mit Hilfe von Viren (Adeno- oder Lentiviren) die DNA in die Zellen eingebracht wird. Für die lentivirale Überexpression wurde die cDNA des ER α in den pLenti 6.2 Vektor kloniert. Dazu wurde der ER α zunächst mit EcoRI aus dem pCRII Vektor geschnitten und eluiert. Zudem wurde pENTR11 mit EcoRI geschnitten und eluiert. Als nächster Schritt konnte nun die cDNA des ER α über die EcoRI-Schnittstellen in pENTR11 (Life Technologies GmbH) ligiert werden (siehe Abb. 11). Daraufhin erfolgte zunächst der Kontrollverdau mit XmnI und SacII. Als nächster Schritt fand die Sequenzierung der positiven Klone mit dem Primer pENTR11 reverse statt und daraufhin die Maxipräparation des Konstruktes. Als nächstes erfolgte die homologe Rekombination in den pLenti 6.2/V5-Dest Vektor (Life Technologies GmbH), der eine Blasticidinresistenz aufweist. Hiernach wurde durch einen Kontrollverdau des Plasmides mit EcoNI die homologe Rekombination der Konstrukte überprüft. Als erneute Kontrolle diente die Sequenzierung der positiven Klone mit CMV forward und V5 reverse. Daraufhin fand die komplette Sequenzierung mit ZP Primern statt (Primersequenzen siehe www.lifetechnologies.com).

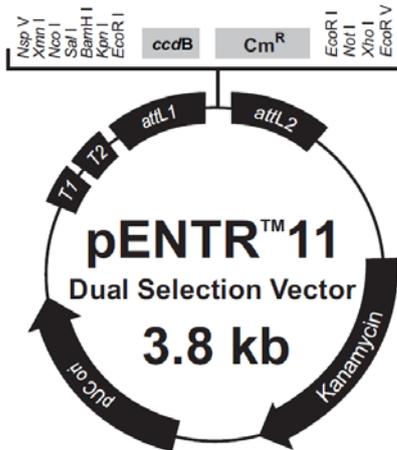


Abbildung 11 Gateway® pENTR™ 11 Vektor (www.lifetechnologies.com. (Mit freundlicher Genehmigung von Life Technologies).

3.9.6 Bioreaktor

Mit dem Ziel, Versuche durchzuführen, die zeigen und messen sollten, welchen Einfluss mechanische Stimulation auf mechanosensitive Zellen hat, haben wir einen multifunktionalen Bioreaktor entwickelt, mit welchem die Möglichkeit geschaffen wurde, widerstandadaptierte, zyklische Dehnungsprotokolle an bestimmten Gewebeproben im Medium und auf flexiblen Zellkulturplatten durchzuführen. Der Reaktor war mit einem Computer verbunden, der das Antriebsmodul steuerte. Somit konnten die Kräfte, die durch das Kraftmess-Modul während des Dehnungsvorganges gemessen wurden, aufgezeichnet werden.

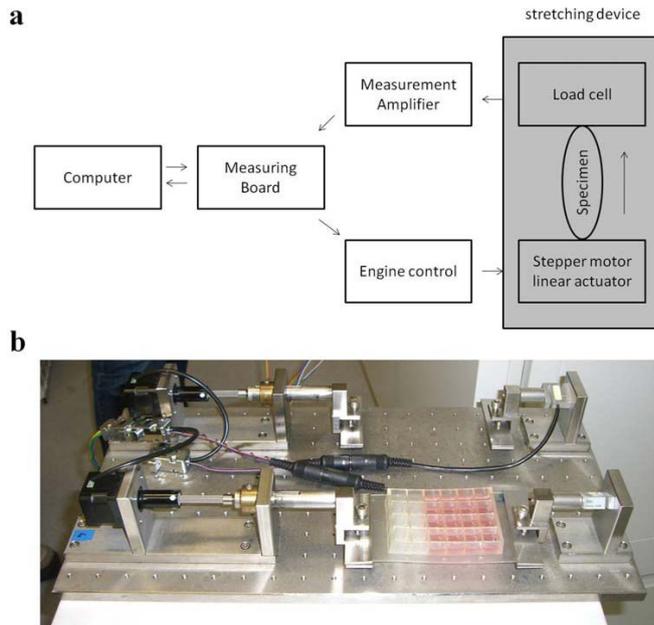


Abbildung 12

a Schematische Darstellung aller Komponenten des Bioreaktors

b Fotografie des neu entwickelten Bioreaktors. Das Bild entspricht der grau hinterlegten Grafik unter a. (Mit freundlicher Genehmigung von AO Research Institute Davos/ECM).

3.9.7 Herstellung der Zellkulturplatten

Bei der Herstellung der Multiwell Zellkulturplatten aus Polyurethan wurde berücksichtigt, eine gleichmäßige Dehnungsverteilung zu erreichen, die sich auf die einzelnen wells, aber auch auf die wells untereinander bezog. Es wurden Konstruktionen von 24 aneinandergrenzenden, rechteckigen wells mit selektiven Modifikationen an Dicke und Form einzelner Trennwände in Verbindung mit einem Aufspannungsgerät verwendet, welches die volle Breite der Platte abdeckt. Es hatte sich gezeigt, dass dieses Konstrukt die bestmögliche Annäherung an eine lange, homogene Dehnungsverteilung sowohl innerhalb der einzelnen wells als auch zwischen den Fächern der unterschiedlichen Stellen innerhalb der 24-well Kulturplatte zeigte.

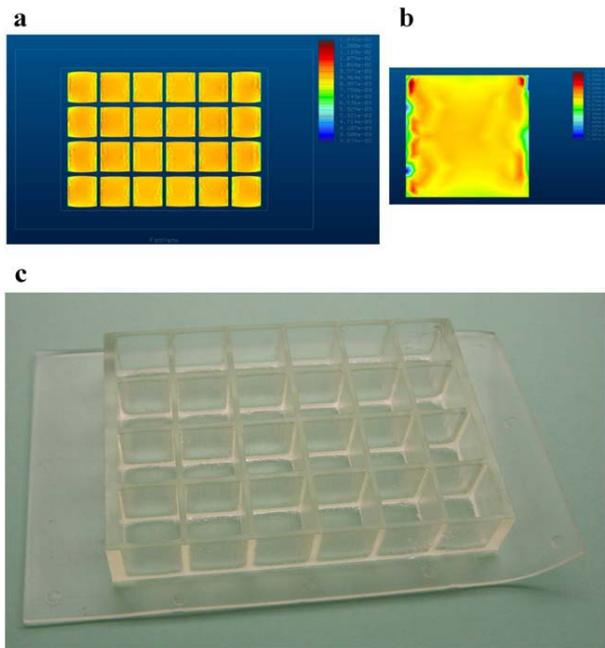


Abbildung 13 Analyse der finiten Elemente

a einer vollständigen 24-well Platte aus Polyurethan (PU) und

b einer einzelnen well. Identische Farben repräsentieren gleiche Dehnung des PU-Materials nach Anwendung von 1%-iger zyklischer Dehnung. Rote Färbung steht für eine hohe, blaue Färbung für eine niedrige Dehnungsbeanspruchung.

c Fotografie einer neu entwickelten Platte aus Polyurethan. (Mit freundlicher Genehmigung von AO Research Institute Davos/ECM).

3.9.8 Zyklische Dehnung von HEK293, hMSC-TERT und primären, mesenchymalen Stammzellen und Luciferase-Assay

Zyklische Dehnung wurde für 30 Minuten bei 0,05 bis 2 Hz und 0,5% bis 5% Extension durchgeführt. Nach Dehnung und Kultivierung der Zellen für weitere 24 h wurden die Zellen geerntet und in 150 µl Reporter Lysis Buffer lysiert. 20 µl jedes Extraktes wurden unter Verwendung des Reporter-Gen-Assays in einem Orion II Luminometer in 96-well Platten bezüglich ihrer Luciferaseaktivität analysiert (siehe auch 3.11).

3.9.9 RT-PCR Analyse des mechanoresponsiven HB-GAM

hMSC Zellen wurden in einer Konzentration von 3×10^4 Zellen/cm² ausgesät und 30 Minuten lang bei 1 Hz und 1% Extension gedehnt. Nach Isolierung der RNA wurden zunächst 2 µg der RNA revers transkribiert, dann erfolgte die Durchführung einer RT-PCR zur Amplifikation des mechanoresponsiven HB-GAM. Es wurde ebenso eine

PCR von EF1 α durchgeführt. Es wurden drei verschiedene Versuche mit primären hMSC durchgeführt. Die Analyse der PCR-Banden erfolgte mittels Densitometrie.

3.10 Immunzytologie

Die Immunzytologie konnte in unserem Fall als Kontrolle nach Herstellung von Klonen dienen. Hierbei macht man sich die Spezifität von Antikörpern zunutze, um die Verteilung von bestimmten Antigenen zu erkennen. In unserem Fall wollten wir den Erfolg der Herstellung der stabilen Zelllinie mit ER α überprüfen. Um dies herauszufinden wurden die Zellen mit primären Antikörpern inkubiert, um einen Antigen-Antikörper-Kontakt herzustellen. Um diese Bindung zu erkennen, mussten die Antikörper sichtbar gemacht werden. Dies erreichten wir durch die Verwendung markierter, sekundärer Antikörper. Voraussetzung für diese Vorgehensweise war die Tatsache, dass die primären und die sekundären Antikörper in Tieren unterschiedlicher Gattung produziert worden waren. Dadurch war der sekundäre Antikörper gegen Proteine der Tiere gerichtet, von denen die Erstantikörper stammten. Der sekundäre Antikörper war seinerseits an einen fluoreszierenden Farbstoff gebunden. Somit konnte der sekundäre Antikörper an den primären Antikörper binden, welcher wiederum eine Bindung zu dem gesuchten Antigen hatte. Im darauffolgenden Waschgang wurden die nicht gebundenen Antikörper gewaschen und schließlich mithilfe des Fluoreszenzmikroskops die Verteilung der Immunfärbung beobachtet und analysiert. Somit konnte man anhand des Signals erkennen, an welchen Stellen das gesuchte Gen vorhanden war. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, fand eine Sättigung der nicht spezifischen Bindungen durch BSA statt, um diese zu blocken. Für die immunzytochemische Färbung wurden 100 000 - 200 000 Zellen in 6-well Platten mit Deckgläsern von 21x26mm Durchmesser ausgesät. Bei einer Konfluenz von 60-80% wurde das Medium abgesaugt und die Platten dreimal mit 2 ml PBS/well bei einem pH von 7,2 bei RT gewaschen. Danach wurden sie mit eiskaltem Methanol fixiert. Dies geschah, indem man die Zellen mit -20°C kaltem MeOH für 5 Minuten inkubierte. Daraufhin ließ man die Zellen für ca. 10 Minuten lufttrocknen. Nach Lufttrocknung folgte die Lagerung bei -80°C. Die folgenden Waschschrte wurden mit 2 ml PBS/well für je 5 min bei RT auf dem Schüttler durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen wurde die Membran der Zellen mit 1x PBS/ 0,05% Tween-20 (pH 7,2) permeabilisiert. Darauf folgten zwei zusätz-

liche Waschschrirte à 5 Minuten und anschließend die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mittels 1x PBS + 3% BSA (pH 7,2) für 30 min bei RT auf dem Schüttler. Erneut wurde mit PBS gewaschen. Nun erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4°C mit 0.5-1 ml des spezifisch gegen ein Protein gerichteten Primärantikörpers in entsprechender Verdünnung in 1x PBS + 1% BSA/ well bei pH 7,2. Nach dreimaligem Waschvorgang wurden 0.5-1 ml des Zweitantikörpers in PBS + 1% BSA bei pH 7,2 auf die Zellen gegeben und bei RT abgedunkelt inkubiert. Nach erneuten drei Waschgängen wurde ein Tropfen Vectashield +DAPI (Kernfärbung) auf den Objektträger gegeben, die Deckgläser aus den 6-well Platten genommen, die Unterseite abgewischt und mit der Zelloberseite in Vectashield-Lösung auf den Objektträger gelegt. Daraufhin konnten die Ergebnisse unter dem Zeiss-Mikroskop ausgewertet werden.

3.11 Luciferase Reporter Assay System

Luciferasen sind in Leuchtkäfern oder Korallen vorkommende Enzyme, welche aufgrund ihrer katalytischen Fähigkeiten, Luciferin umzusetzen, in der Lage sind, Licht zu erzeugen. Dies kann in der Molekularbiologie dazu benutzt werden, die Promotoraktivität und somit Expression von Genen zu analysieren und zu quantifizieren. Nach Kopplung des zu untersuchenden Promotors an die cDNA der Luciferase kann man die Promotoraktivität bestimmen und quantifizieren. Die Luciferase agiert hierbei als Reporter gen. Die Lichtemission kann mittels Luminometer gemessen werden.

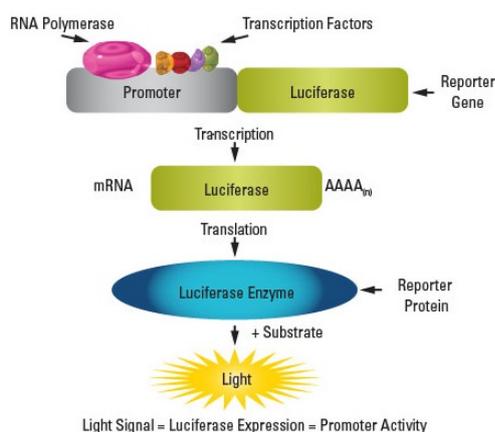


Abbildung 14 Diagramm des Luciferase Reporter Assays (<http://www.piercenet.com/media/Luciferase-Reporter-Assays-450px.jpg>). (Mit freundlicher Genehmigung von Life Technologies).

Material und Methoden

Durch die katalytische Aktivität der Luciferasen reagieren Luciferine mit O_2 und ATP zu Oxyluciferin. Hierbei kommt es zur Freisetzung von AMP, PP_1 , H^+ und CO_2 sowie Licht und somit zur Biolumineszenz (siehe Abb. 15).

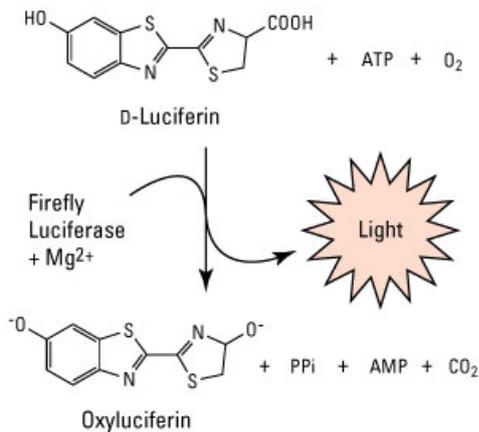


Abbildung 15 Biolumineszente chemische Reaktion der Firefly Luciferase (<http://www.piercenet.com/media/16174-Lucif-Firefly-rxn.jpg>). (Mit freundlicher Genehmigung von Life Technologies).

Um diese Messungen durchzuführen verwendeten wir das Luciferase® Reporter Assay System von Promega mit der Luciferase des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* (Firefly Luciferase). Die Firefly Luciferase, ein Monomer von 61 kDa, katalysiert die Oxidation des Luciferin mit ATP- Mg^{2+} als Co-Substrat. Somit kann anhand der Firefly Luciferase die Aktivität des Gens von Interesse gemessen werden. Als Vektor wurde der pGL4.14 Vektor verwendet (Abb. 8).

24 Stunden nach Durchführung der Transfektion wurden die Zellen nach Entfernen des Mediums zweimalig auf der 96-well Platte mit PBS gewaschen und dies danach gründlich entfernt. Es wurden 200 μ l des Reporter Lysis Puffers pro well hinzugefügt und die Platten danach bei $-20^\circ C$ gelagert. Nach erneutem Erreichen der Raumtemperatur wurden das Lysat einerseits der Proteinbestimmung unterzogen (siehe 3.12) sowie andererseits die Luciferasemessung durchgeführt. Zu 20 μ l Zelllysat wurden 100 μ l Luciferase Assay Reagent zugegeben und in einem Orion II Luminometer in 96-well Platten bezüglich ihrer Luciferaseaktivität analysiert. Relative Lichteinheiten (RLU) wurden auf den Proteingehalt unter Verwendung des RotiQuant Protein Assays bezogen. Der Mittelwert wurde aus 4 Messpunkten gebildet.

3.12 Proteinmessung

Die parallel durchgeführte Proteinmessung nach Bradford dient der quantitativen Bestimmung von Proteinen und ist eine schnelle und sensitive Methode. Bei dieser Methode macht man sich zunutze, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue-G520 in drei Zuständen vorkommt und bei jeweils unterschiedlichen Längen absorbiert wird. Hierbei kommt es bei Proteinbindung zum Übertritt des Farbstoffes vom kationischen in den anionischen Zustand. Die Absorption wird bei 595 nm gemessen. Die Absorptionsänderung ist über weite Bereiche proportional zur Proteinkonzentration und kann somit zur Konzentrationsbestimmung verwendet werden. In Doppelwerten wurden 20 µl der zu messenden Probe sowie unterschiedliche Konzentrationen eines Proteinstandards (Tab. 11) mit 200 µl RotiQuant auf einer 96-well Platte vermischt. Danach wurden die einzelnen Proben im ELISA Reader bei einer definierten Absorption von 595nm gemessen und die Proteinkonzentration anhand der Standardkurve bestimmt.

BSA (µg/ml)	µl aus BSA-Lösung 50 mg/ml
0	0
200	0,4
500	1
1000	2
1500	3
2000	4

Tabelle 11 Pipettierschema für die BSA-Standardverdünnungsreihe

4 Ergebnisse

4.1 Klonierungsarbeiten

4.1.1 ER β

4.1.1.1 Sequenzierung des ER β Klons im pBluescriptR

Nach Erhalt des ER β Klons wurde derselbe im pBluescriptR (pBS-ER β) Vektor mithilfe der Sequenzierungsprimer T7promotor und T3promotor nach dem unter 3.6 beschriebenen Protokoll sequenziert. Hierbei konnte bestätigt werden, dass die gewünschte DNA-Sequenz nachzuweisen war.

4.1.1.2 Klonierung ER β

Nach Erhalt des pBS-ER β Klons wurden die notwendigen Vorbereitungen für die am nächsten Tag stattfindende Plasmidpräparation durchgeführt. Hierbei resultierte doppelsträngige DNA in einer Konzentration von 2,452 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Es folgte der Verdau des Expressionsvektors pcDNA3.1⁻ und des pBS-ER β mit XhoI und BamHI für 3 h bei 37°C. Es erfolgte schließlich das Auftragen auf ein Agarosegel (Abb. 16).

pBS-ER β pcDNA3.1⁻

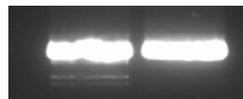
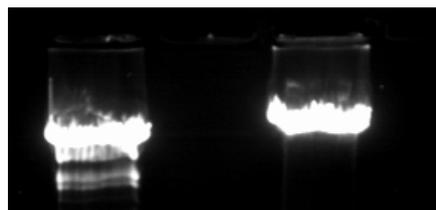


Abbildung 16 Xho I und BamH I Verdau von pBS-ER β und pcDNA3.1⁻Vektor

Auf diesem Gel waren dann besonders nach Auftragen des restlichen Verdau sowohl die Bande des pcDNA3.1⁻ als auch die Bande des ER β zu sehen (Abb. 17).

pBS-ER β pcDNA3.1⁻



Ergebnisse

Abbildung 17 Restlicher Verdau von 19 μ l im Agarosegel, die untere Bande des pBS-ER β Verdau wurde eluiert

Nach Auftragen des gesamten Verdau auf ein Agarosegel und der Extraktion der erschienenen Banden konnte die DNA eluiert werden. Es folgte die Ligation des ER β in den pcDNA3.1⁻ Vektor. Diese Ligation war dann einer der Bestandteile der darauffolgenden Transformation in NEB5 α Bakterien nach dem unter 3.5.2 beschriebenen Schema.

Zur Überprüfung der Klonierung wurde die Plasmid-DNA von 10 Klonen schließlich mit den außenliegenden Restriktionsenzymen XbaI und HindIII verdaut. Das Ergebnis nach Auftragen der Verdau auf ein Agarose Gel ist unter Abb. 18 zu sehen.

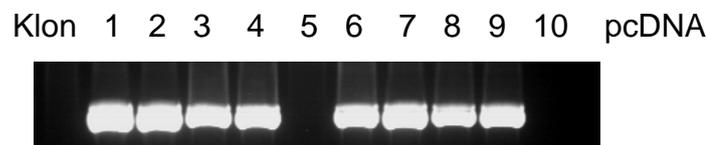


Abbildung 18 Klon 1-10 des pcDNA3.1-ER β Konstruktes verdaut mit XbaI und HindIII

Die Klonierung des ER β wurde durch Sequenzierung eines positiven Klons überprüft und konnte bestätigt werden.

Zur Generierung stabiler hMSC-TERT-Klone wurde das pcDNA3.1-ER β Konstrukt mit SspI linearisiert und anschließend durch Elektroporation in die Zellen transfiziert. Der Linearisierungsverdau wurde zuerst wiederum auf ein Agarosegel aufgetragen, von welchem die linearisierte DNA zunächst extrahiert und schließlich eluiert werden konnte. Diese linearisierte pcDNA3.1-ER β -DNA mit einer Konzentration von 0,702 μ g/ μ l wurde schließlich für die Herstellung eines stabilen Klons mittels Elektroporation verwendet, wobei das unter 3.8.2 beschriebenen Schema befolgt wurde.



Abbildung 19 SspI Verdau des pcDNA-ER β Konstruktes zur Linearisierung

Ergebnisse

4.1.2 ER α

Bei den Versuchen mit ER α wurde mit einer für ER α stabilen Zelllinie gearbeitet, die entsprechend den Beschreibungen unter 3.4 hergestellt worden war und mir als Tool zur Verfügung stand.

4.1.2.1 Immunzytochemie

Um zu überprüfen, ob ER α in der stabilen hMSC-TERT-Zelllinie exprimiert wird, wurde eine Immunzytochemie durchgeführt, deren Ergebnis den Verdacht aufkommen ließ, dass es sich hierbei nicht um einen stabilen ER α Zellklon handelte.

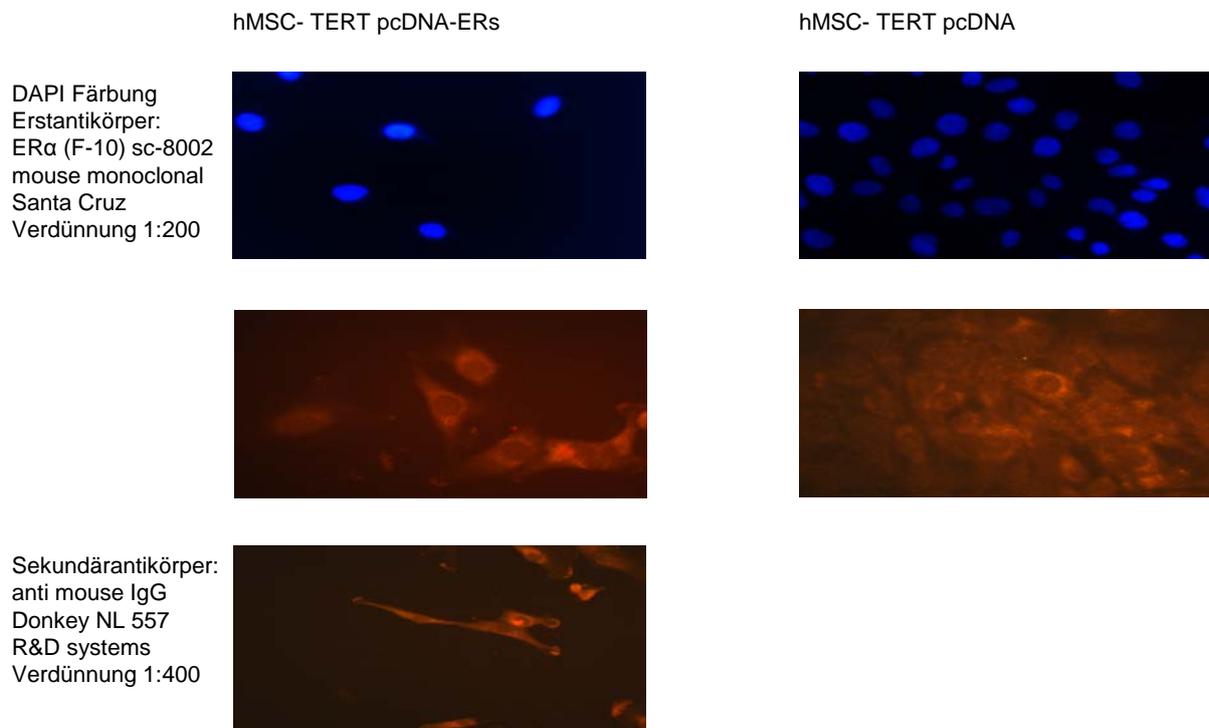


Abbildung 20 Durchgeführte Immunzytochemie an hMSC-TERT-Zellen mit vermeintlich stabiler Expression von ER α

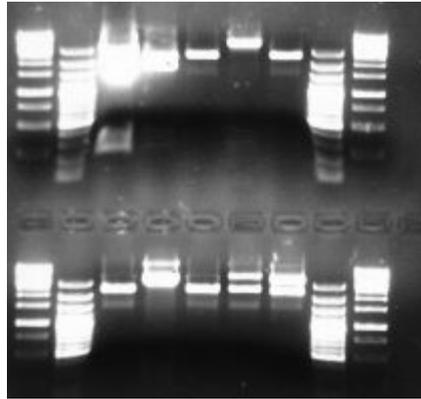
4.1.2.2 Lentivirale Überexpression

Um ER α auch in primären Zellen überexprimieren zu können wurde ein lentivirales Expressionskonstrukt für ER α kloniert. Hierbei wurde, nachdem ER α aus dem pCRII Vektor mit EcoRI geschnitten und eluiert worden war und pENTR11 ebenso mit EcoRI

Ergebnisse

geschnitten und eluiert wurde, der ER α über die EcoRI Schnittstellen in den pENTR11 ligiert und dies in einem Kontrollverdau mit XmnI und SacII kontrolliert (Abb. 21).

1kb 100bp V11 V12 V13 V14 V15 100bp 1kb



1kb 100bp V16 V17 V18 V19 V20 100bp 1kb

Abbildung 21 Verdau pENTR11-ER α mit XmnI und SacII

Die darauffolgende Sequenzierung bestätigte das Vorhandensein der Sequenz (Abb. 22).

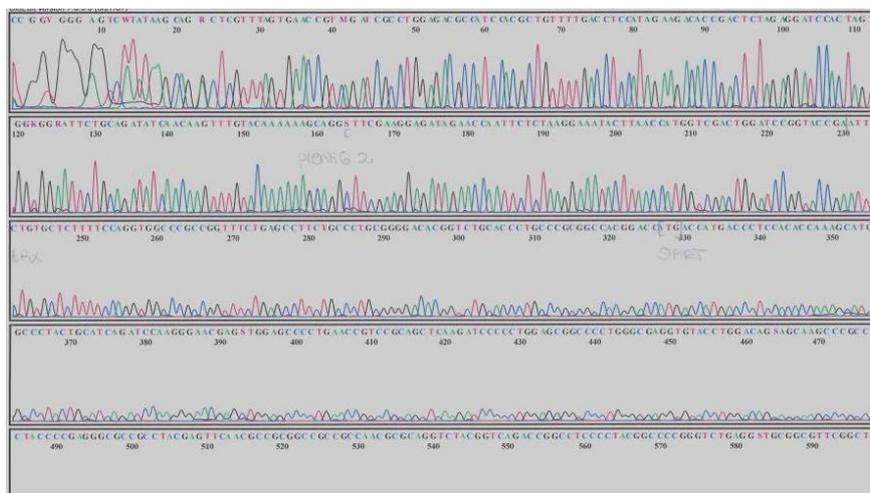


Abbildung 22 Sequenzierung des pENTR11-ER α Konstruktes

Ergebnisse

Nach Auswertung dieser Sequenzierungen wurde deutlich, dass die klonierte Sequenz, die in den lentiviralen Vektor eingebracht worden war, vier Mutationen aufwies bei Veränderung einer Aminosäure.

Aktuelle Sequenz:

gctgtgctctttccagggtggcccgccggttctgagccttctgccctgcggggacacgggtctgcaccctgccgcggcca
cggaccatgaccctccacacaaagcatctgggatggcctactgcatcagatccaaggaacgagctg
gagccccctgaaccgtccgagctcaagatccccctggagcggccccctgggaggtgtacctggacagcagcaag
cccgccgtgtacaactaccccgagggcgccgctacgagttcaacgccgcggccgcccaacgcgcagggtctac
ggtcagaccggcctcccctacggccccgggtctgaggctgcggcgttcggctccaacggcctggggggttcccccc
actcaacagcgtgtctccgagcccgtgatgctactgcaccgccgcgagctgtcgctttctgcagccccacgg
ccagcaggtgccctactacctggagaacgagcccagcggctacaggggtgcgcgaggccggccccgccggcattcta
caggccaaattcagataatcgacgccagggtggcagagaaagattggccagtaccaatgacaaggaagtatgg
ctatggaatctgccaaggagactcgctactgtgagtgcaatgactatgcttcaggctaccattatggagtctggtcct
gtgagggctgcaaggccttctcaagagaagtattcaaggacataacgactatatgtgtccagccaccaaccagtgc
accattgataaaaacaggaggaagagctgccaggcctgccggctccgcaaatgctacgaagtgggaatgatgaaa
gggtgggatacgaagaccgaagaggaggagaatggtgaaacacaagcgcagagagatgatggggagggc
aggggtgaagtgggtctgctggagacatgagagctgccaactttggccaagcccgctcatgacaaacgctctaa
gaagaacagcctggcctgtccctgacggccgaccagatggtcagtgccctgttgatgctgagccccatactctat
tccgagtatgatcctaccagacccttcagtgaagcttcgatgatgggcttactgaccaacctggcagacagggagctg
gttcacatgatcaactgggcgaagagggtgccaggcttctgtgattgacctccatgatcaggtccaccttctagaatg
tgcttgctagagatcctgatgattggtctcgtctggcgtccatggagcaccaggaagctactgtttgcctccgaactt
gctctggacaggaaccagggaaaatgtgtagagggcatgggtggagatcttcgacatgctgctggctacatcatctcg
gttccgcatgatgaatctgcagggagaggagttgtgtgcctcaaatctattttgcttaattctggagtgtacacatttct
gtccagaccctgaagtctctggaagagaaggaccatatccaccgagtcctggacaagatcacagacactttgatcc
acctgatggccaaggcaggcctgaccctgcagcagcagcaccagcggctggcccagctcctcctcatcctctccca
catcaggcacatgagtaacaaaggcatggagcatctgtacagcatgaagtgaagaacgtgggtgcccctctatgac
ctgctgctggagatgctggacgccccccgctacatgcgcccactagccgtggaggggcatccgtggaggagacg
gaccaaagccactggccactgcgggctctactcatgcattccttgcaaaagtattacatcacgggggagggcagag
ggttccctgccacggctgagagctccctggctcccacacgggtcagataatccctgctgcattttaccctcatcatgca
cca

Ergebnisse

Abbildung 23 Aktuelle ER α Sequenz in stabilem Klon, von der gewünschten Sequenz veränderte Basen grau hinterlegt. Das Start- und das Stop-Codon wurden rot markiert.

Nachdem deutlich war, dass die ER α Sequenz, mit der zuvor gearbeitet worden war, verschiedene Mutationen besaß, wurde angestrebt, neue hMSC-TERT-ER α -Zellen ohne Mutationen zu etablieren. Die Sequenz des pENTR11-ER α Konstrukts wurde entsprechend mutiert und der publizierten Sequenz für ER α angepasst.

4.1.2.3 Mutagenese

Hierbei wurde die Mutagenese wie unter 3.7 erläutert mit den unter 2.5.3 aufgelisteten Punktmutationsprimern durchgeführt. Die Sequenzierung zeigte ein Vorhandensein der korrekten Sequenz.

Nach Durchführung einer Präparation des pENTR11-ER α Konstruktes erfolgte die homologe Rekombination in den pLenti6.2/V5-Dest Vektor mit einer vorhandenen Blastizidin-Resistenz. Hiernach erfolgte ein Kontrollverdau mit EcoNI (siehe Abb. 24), in welchem sich drei positive Banden zeigten (Proben V1-V5).

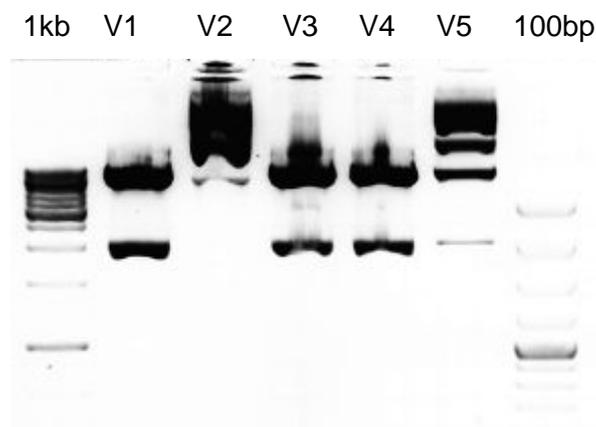


Abbildung 24 Verdau ER α in pLenti6.2/V5-Dest

Nach Sichtbarwerden der Banden wurde mit den positiven Klonen eine Sequenzierung mit den in Kapitel 2.1 erwähnten ZP Primern durchgeführt.

Immunzytochemie nach transientscher Transfektion:

Zur Überprüfung wurde erneut eine Immunzytochemie mit Transfektion des pLenti6.2/V5-Dest-ER α in Cos7 Zellen und den unter 2.6 erwähnten Antikörpern durchgeführt (siehe Abb. 25).

Ergebnisse

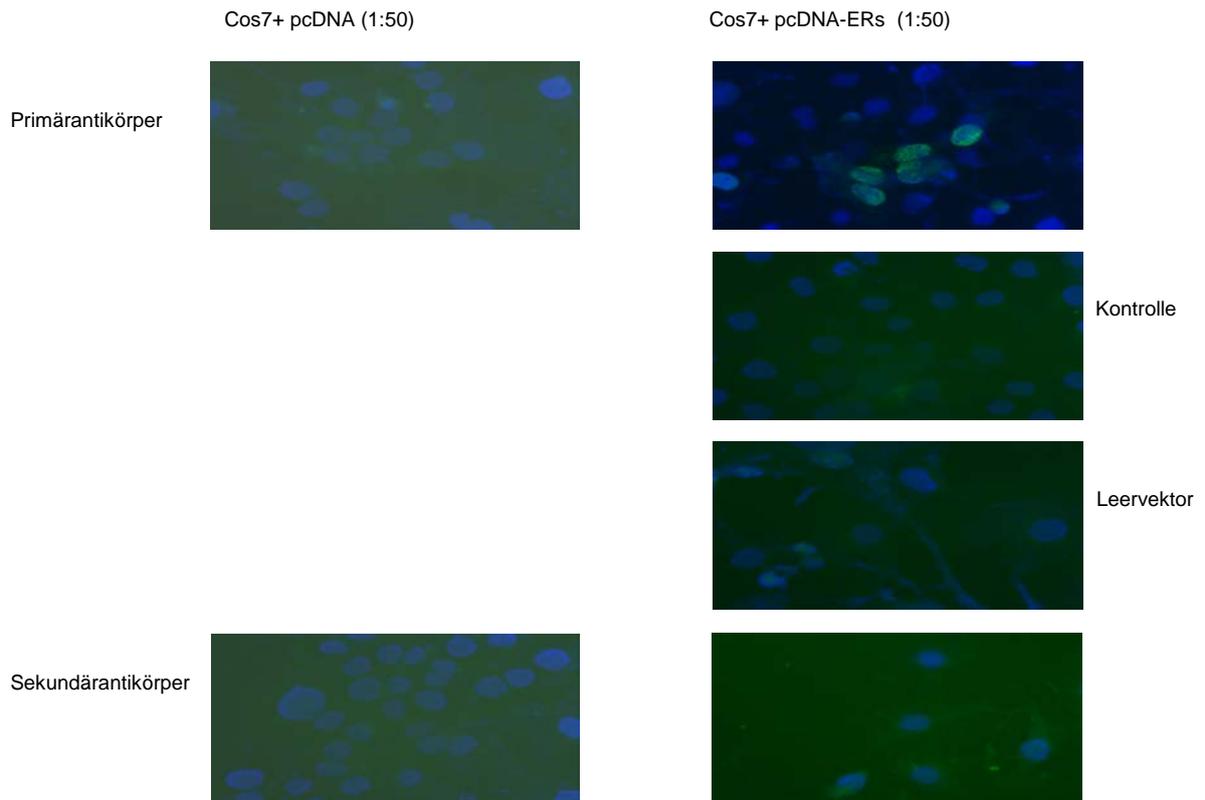


Abbildung 25 Immunzytochemie $ER\alpha$ -Expression nach Transfektion des pLenti6.2/V5-Dest- $ER\alpha$ in Cos7 Zellen

In der anschließend durchgeführten PCR mit dem überexprimierten $ER\alpha$ war eine deutliche Signalverstärkung im Bereich der überexprimierten Versuche zu sehen (siehe Abb. 26).

Ergebnisse

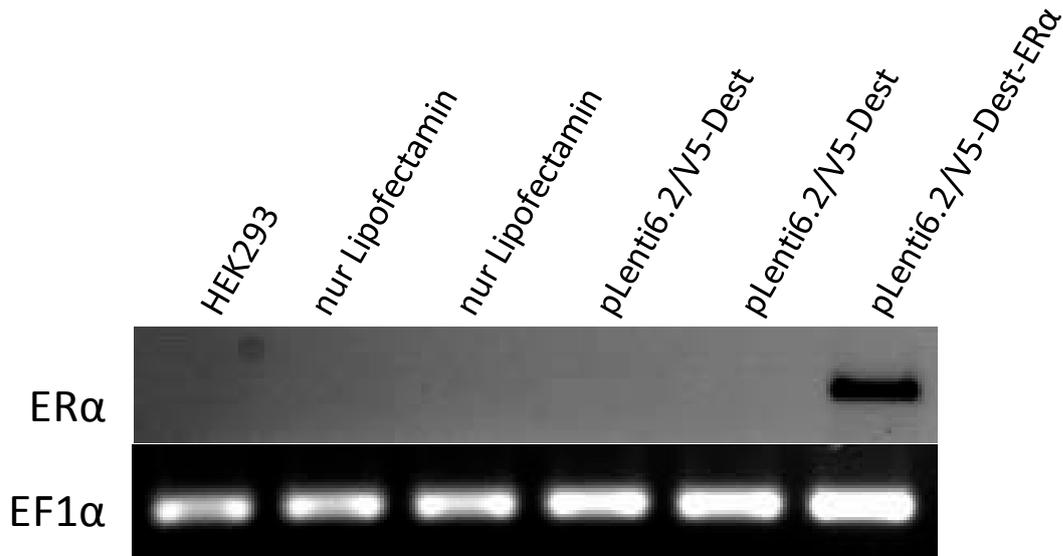


Abbildung 26 PCR mit transient lentiviral überexprimiertem ER α und EF1 α als housekeeping Gen

Hiermit konnte gezeigt werden, dass der ER α überexprimiert werden konnte, und mithilfe der Sequenzierung konnte schließlich nachgewiesen werden, dass nun eine ER α Sequenz vorhanden war, in der die Mutationen nicht mehr präsent waren.

4.2 Überprüfung

4.2.1 Modulation von ER α - und ER β -Zellen

In der Zellkultur wurde mit einer stabilen Zelllinie gearbeitet, die durch Elektroporation von hMSC-TERT-Zellen mit pcDNA3.1-ER α sowie pcDNA3.1-ER β entstanden war (siehe auch 3.8.2). Diese Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von E2 und dem Anti-Östrogen ICI182870 in der Zellkultur unter den unter 3.9.1 beschriebenen Bedingungen kultiviert. Bei 70-80% Konfluenz der Zellen wurden jene mit dem für sie bestimmten Medium versorgt. Nach Beendigung der Stimulation wurde die RNA geerntet und in nachfolgenden PCRs beobachtet, ob es Veränderungen oder Unterschiede unter den unterschiedlich stimulierten Zellen bezüglich der Genexpression von ER α oder ER β gab.

Ergebnisse

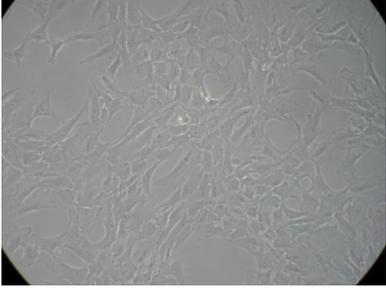
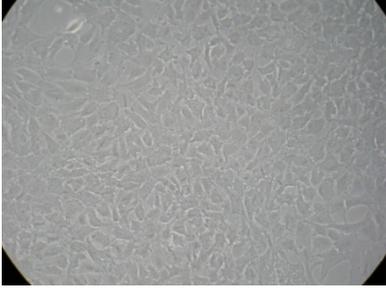
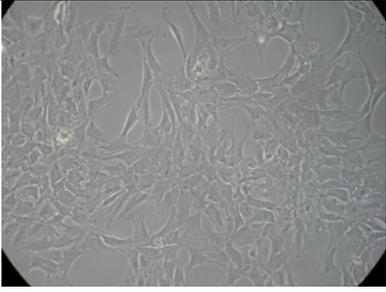
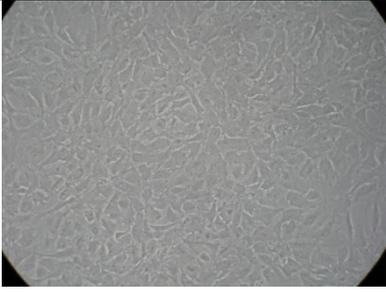
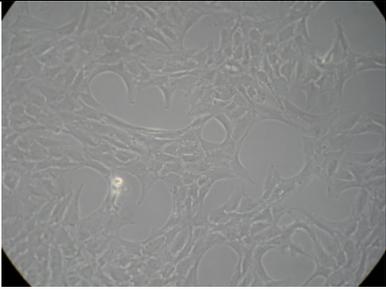
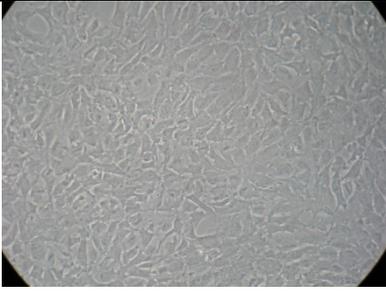
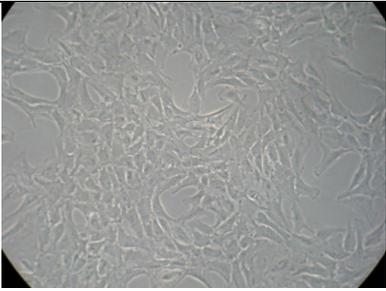
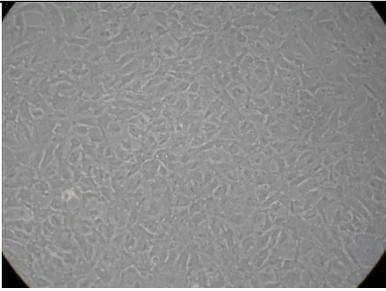
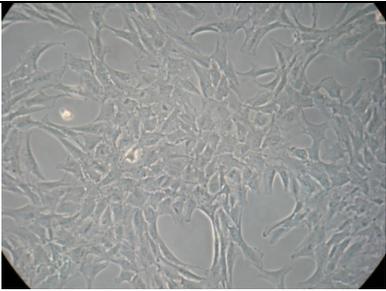
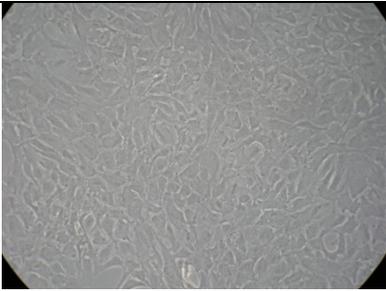
	24h vor Ernte; Beginn der Stimu- lation	Tag des Erntens nach 24h Sti- mulation
Kontrolle		
Stimulation mit E2 (10^{-6} M)		
Stimulation mit E2 (10^{-8} M)		
Stimulation mit E2 (10^{-6} M) + ICI182870 (10^{-6} M)		
Stimulation mit E2 (10^{-8} M) + ICI182870 (10^{-8} M)		

Abbildung 27 Fotografien der stabilen hMSC-TERT-ER α -Zellen vor Stimulation und am Tag der Ernte nach 24 h Stimulation; Vergrößerung x 20

Ergebnisse

Bei der Auswertung der Versuche an den stabilen hMSC-TERT-ER α -Zellklonen 9, 10 und 11 kam es zu folgenden Ergebnissen:

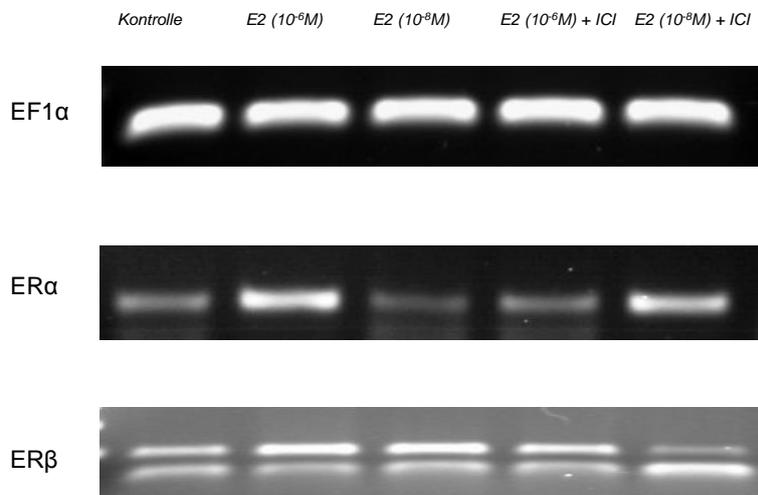


Abbildung 28 E2 24-h-Stimulation bei 70-80% Konfluenz, Nachweis von ER α , ER β und EF1 α als housekeeping Gen mittels RT-PCR

4.2.2 Charakterisierung von Reportergenkonstrukten mit DNA Response-Elementen nach mechanischer Stimulation

Es folgten Dehnungsversuche an mit unterschiedlichen Reporterkonstrukten stabil transfizierten hMSC-TERT-Zellen. Hierbei wurden für Luciferase-basierte Reportergenkonstrukte (pGL4.14-ERE, pGL4.14-SSRE, pGL4.14-AP1, pGL4.14-SP1, pGL4.14c-ERE-SSRE, pGL4.14-ERE-SP1 und pGL4.14 Leervektor) stabile hMSC-TERT-Zellen unter den unter 3.9.2 beschriebenen Bedingungen gedehnt und die Aktivität der Luciferase anschließend unter Zugabe des Luciferase-Substrats nachgewiesen. Die Aktivität der Luciferase diente hierbei als Readout und somit als Parameter für die Aktivierung der responsiven Elemente.

4.2.2.1 Charakterisierung der stabilen mechanoresponsiven AP1-, SP1-, SP1-SSRE- und ERE-SSRE-Zelllinien

Nach Auswertung der Versuche mit Luciferase-Induktion durch Dehnung konnte man feststellen, dass es im Vergleich zur Kontrolldehnung der Zellen mit Leerkonstrukt (pGL3basic ohne responsives Element), die nach Dehnung keine Veränderung der Luciferase-Aktivität nach sich zogen, bei den unterschiedlichen Zellen mit den einzelnen responsiven Elementen (pGL3basic+ERE; pGL3basic+SSRE; pGL3basic+AP1;

Ergebnisse

pGL3basic+SP1) zu deutlichen Aktivitätsunterschieden vor und nach Dehnung kam. So sind bei den Versuchen mit transfizierten AP-1, AP-1+SSRE und SP1 deutliche Aktivitätszunahmen zu erkennen. Interessant hierbei ist, dass die Versuche mit ERE und ERE+SSRE, bei welchen man aufgrund des Vorhandenseins des Östrogenresponsiven Elements eine erkennbare Aktivitätszunahme erwartet hatte, stattdessen eine deutliche Aktivitätsverminderung zeigten und damit eine Hemmung der Expression als Antwort auf Dehnung vermitteln würden (siehe Abb. 29).

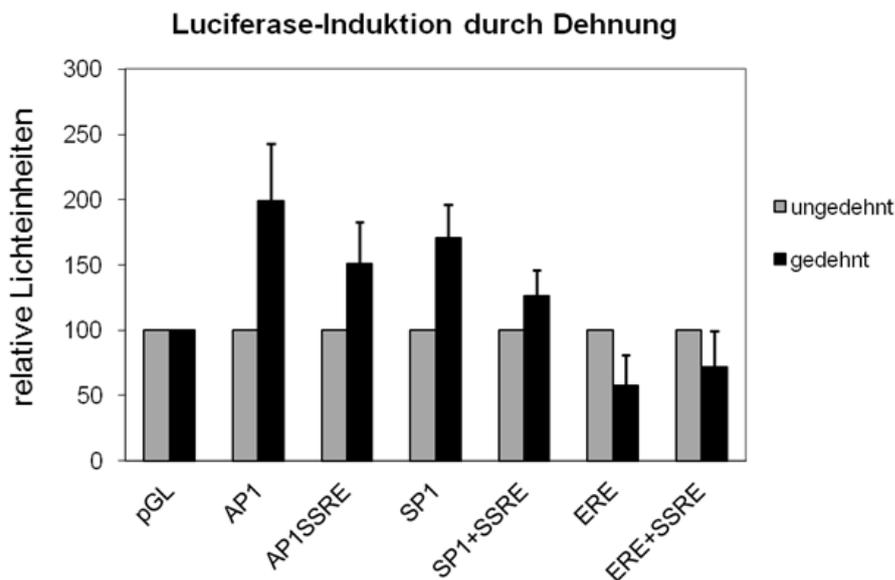


Abbildung 29 Luciferase-Induktion durch Dehnung. (Mit freundlicher Genehmigung des AO Research Institute Davos/ECM).

Bei der Etablierung der stabilen hMSC-TERT-AP1- und hMSC-TERT-SP1-Zellen wurde mit unterschiedlichen Bedingungen, mit einer Extension von 0,5% bis 2% (SP-1 Klon) und von 0,5% bis 5% (AP-1 Klon), stimuliert. Das SP1 Konstrukt zeigte die stärkste Reaktion bei einer Extension von 0,5%, einen Rückgang der Aktivität bei einer Extension von 1% und keinen Effekt bei 2%-iger Dehnung. Das AP1 Konstrukt hatte die stärkste Reaktion bei 1% Extension und zeigte weniger starke Induktion bei Amplituden von 0,5%, 2% oder 5% Dehnung. Die hMSC-TERT-Kontrollzellen zeigten keinerlei Reaktion auf mechanische Dehnung. Es wurden zusätzlich unterschiedliche Frequenzen angewandt, startend bei 0,05 Hz bis zu 2 Hz. Das AP1-responsive Element wurde sehr stark bei 0,05 Hz und 1 Hz induziert, während andere Frequenzen eine niedrigere Induktion der Luciferase-Aktivität verursachten. Um die Spezifität des

Ergebnisse

AP1 Signals zu validieren, wurden die Zellen zwei Tage lang mit dem Kalziumkanalblocker Verapamil vorbehandelt, der die AP1 vermittelte Mechanoresponsivität in hMSC-TERT-AP1-Zellen komplett supprimierte. In den Kontrollzellen hatte die Gabe von Verapamil keinen Einfluss.

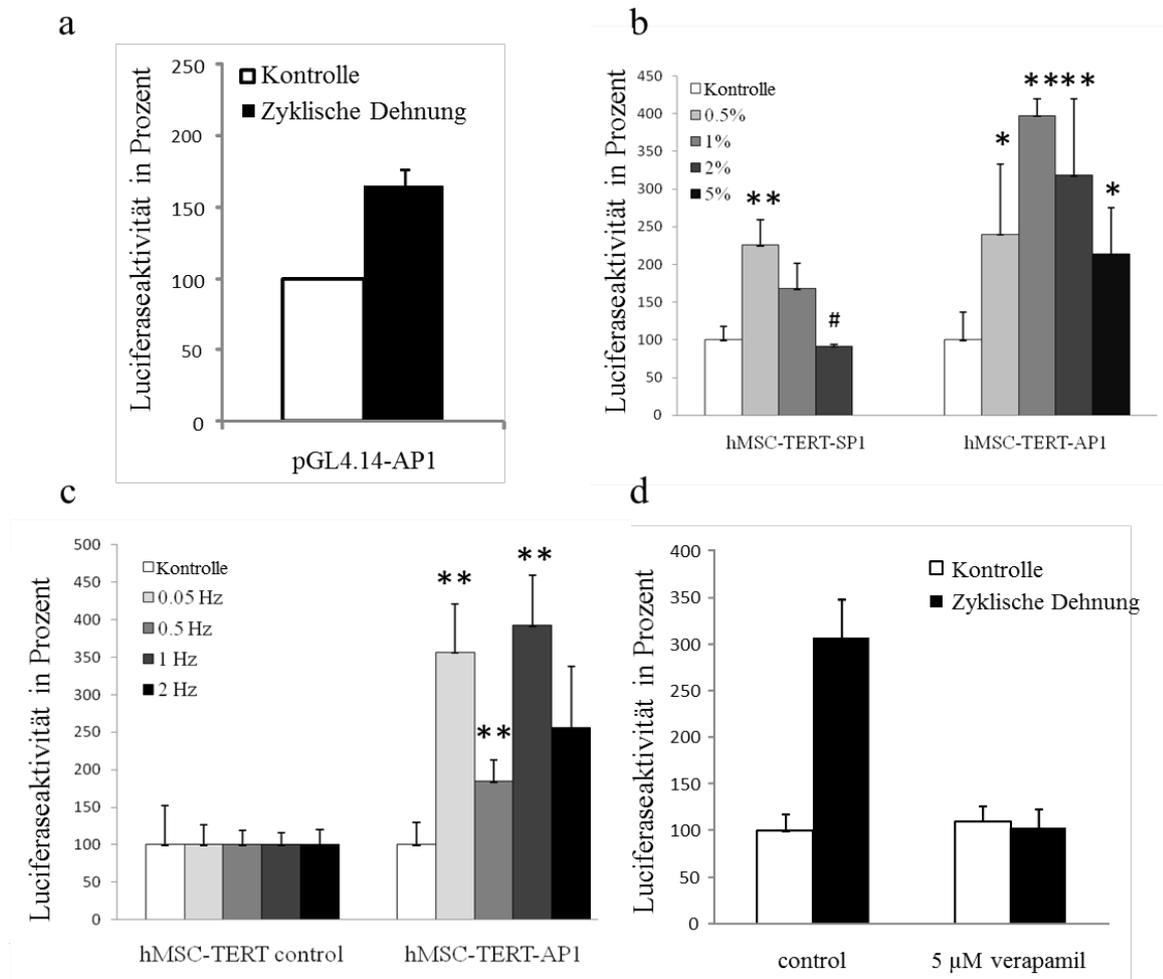


Abbildung 30 Luciferase-Aktivität der mechanoresponsiven Reporter-Konstrukte

a) Transiente Transfektion des pGL4.14-AP1-Reporter-Konstruktes in HEK293-Zellen und Zellstimulation durch zyklische Dehnung mit 1% Dehnung und 1 Hz Frequenz (schwarze Säule). Die weiße Säule repräsentiert die unstimulierte Kontrolle.

b) Stabile hMSC-TERT-SP1- und hMSC-AP1-Zellen wurden bei variabler Dehnung bei einer konstanten Frequenz von 1 Hz stimuliert.

c) hMSC-TERT-AP1-Zellen wurden bei variabler Frequenz bei einer konstanten Dehnung von 1% stimuliert.

Ergebnisse

d) hMSC-TERT-AP1-Zellen wurden mit dem Kalziumkanalblocker Verapamil behandelt und bei 1%-iger Dehnung und einer Frequenz von 1 Hz stimuliert (schwarze Säule). Die weiße Säule repräsentiert die ungedehnte Kontrolle.

*Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert (\pm SEM) von drei unabhängigen Versuchen mit je 4 Messpunkten. In der statistischen Analyse wurde zur Signifikanztestung der Student's t-Test verwendet (**: $p < 0.001$, *: $p < 0.01$, #: $p < 0.05$). (Mit freundlicher Genehmigung des AO Research Institute Davos/ECM).*

4.2.2.2 Ergebnisse der mechanischen Stimulation von primären MSC nach Transduktion von lentiviralen mechanoresponsiven Luciferase-Reporter-Konstrukten

Die kodierende Sequenz der Glühwürmchen-Luciferase, das SP1 und das AP1 responsive Element wurden in einen lentiviralen Expressionsvektor (pLenti-SP1 und pLenti-AP1) kloniert, um die Möglichkeit zu schaffen, die mechanische Dehnung in primären mesenchymalen Stammzellen zu analysieren. Nach der Anwendung von Dehnung auf pLenti-AP1 und pLenti-SP1 transduzierte primäre hMSC wurde die Luciferaseaktivität auf das bis zu 1,6- und 2,3-fache erhöht. Es zeigte sich keine Reaktion in Zellen, die mit dem Leervektor transduziert wurden.

Die Versuche zeigten eine sehr starke Reaktion des pLenti-SP1 Vektors bei zyklischer Dehnung. Auch zeigt der pLenti-AP1 Vektor eine Reaktion auf die Dehnung, jedoch im Vergleich zu pLenti-SP1 vermindert. Der Nullvektor pLenti-0 zeigt erwartungsgemäß keine Reaktion.

Ergebnisse

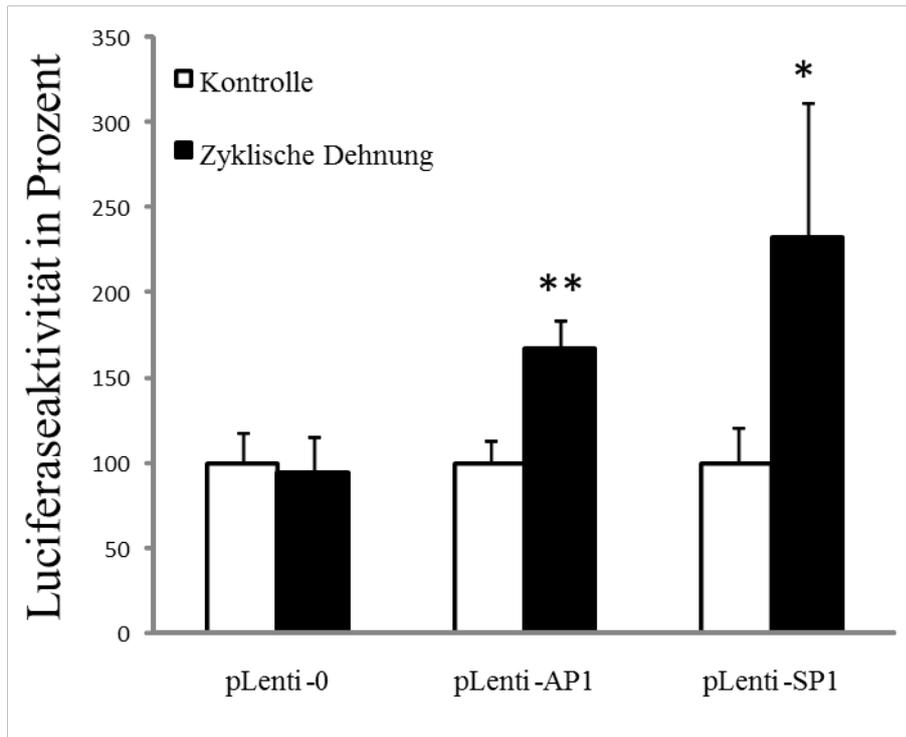


Abbildung 31 Lentivirale Transduktion primärer mesenchymaler Stammzellen mit den neu entwickelten Luciferase-Reporter-Vektoren. pLenti-AP1, pLenti-SP1 und pLenti-0 Luciferase Konstrukte wurden in hMSC transduziert. Diese Zellen wurden bei 1 Hz und 1%-iger Dehnung stimuliert (schwarze Säulen). Die weißen Säulen repräsentieren die unstimulierten Kontrollen. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert (\pm SEM) von vier unabhängigen Versuchen mit je 4 Messpunkten. In der statistischen Analyse wurde zur Signifikanztestung der Student's t-Test verwendet (**: $p < 0.001$, *: $p < 0.01$). (Mit freundlicher Genehmigung des AO Research Institute Davos/ECM).

4.2.2.3 Regulation des mechanoresponsiven Gens HB-GAM

Um weiter zu analysieren, ob der hier beschriebene Bioreaktor und die PU Platten geeignet für mechanische Stimulation sind, wurden drei verschiedene Präparationen an mesenchymalen Stammzellen mittels zyklischer Dehnung stimuliert und die Expression des mechanoresponsiven Gens HB-GAM mithilfe der RT-PCR in den drei verschiedenen hMSC Präparationen analysiert. Die Banden wurden densitometrisch ausgewertet. Die Expression von HB-GAM war durch zyklische Dehnung signifikant 1,7-fach hochreguliert, wobei hier eine große Variabilität bezüglich der Spender beobachtet worden war.

Ergebnisse

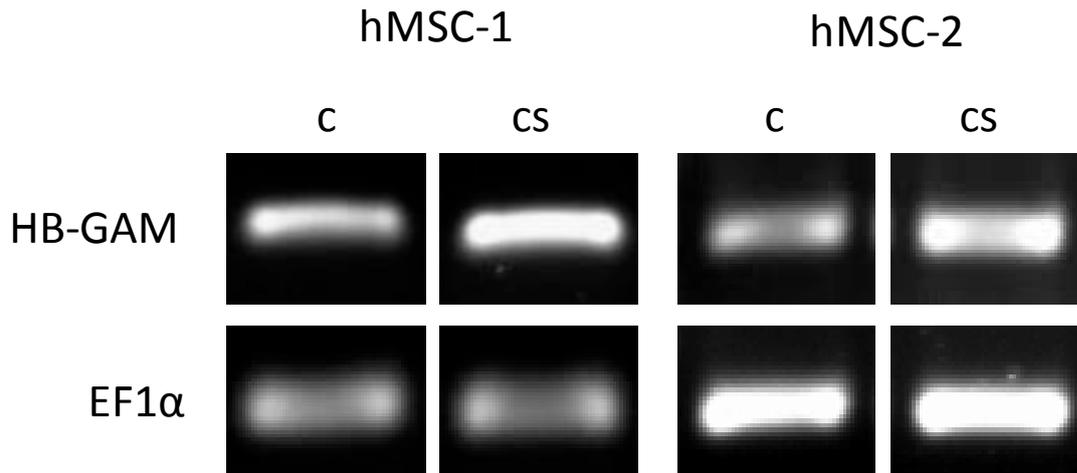


Abbildung 32 Expression des mechanorensponsiven Gens HB-GAM in zwei unterschiedlichen hMSC Präparationen nach zyklischer Dehnung. (Mit freundlicher Genehmigung des AO Research Institute Davos/ECM).

4.2.3 Effekte der transienten Überexpression von ER α und ER β auf die Luciferaseaktivität

Wie bereits unter 3.9.1 beschrieben wurden bei der transienten Transfektion HEK293-Zellen mit pGL4.14, pGL4.14-ERE und pGL4.14-ERE+SSRE transfiziert und mit pcDNA3.1-, pcDNA3.1-ER α und pcDNA3.1-ER β cotransfiziert. Zusätzlich wurden die verschiedenen Ansätze durch Nährmedium, das unterschiedlich mit Östrogenen (E2) und dem Antiöstrogen ICI 182-780 versetzt wurden, auf die einzelnen wells verteilt (genauer Versuchsaufbau siehe Tab. 9 und Abb. 10).

Ergebnisse

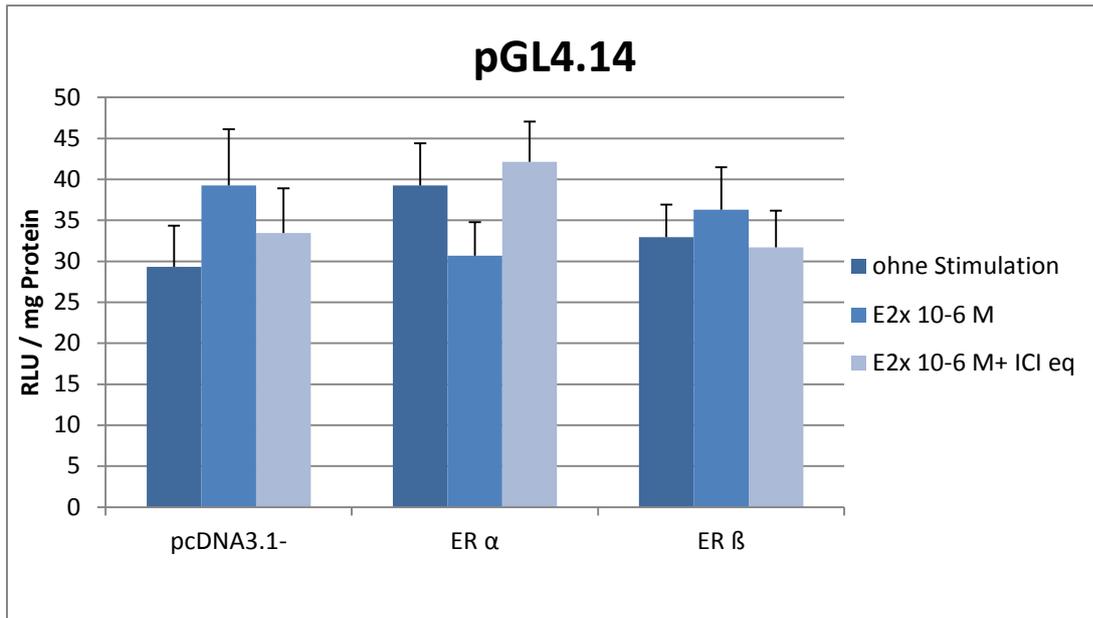


Abbildung 33 HEK Zellen transfiziert mit dem Leervektor pGL4.14 und cotransfiziert mit pcDNA3.1⁻, pcDNA3.1⁻-ER α und pcDNA3.1⁻-ER β ; 24h- Stimulation mit E2 und E2 + ICI 182-780 (Die Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei Messpunkten gebildet)

An den mit dem Leervektor pGL4.14 transfizierten und mit pcDNA3.1⁻ cotransfizierten HEK Zellen zeigte sich zunächst nach Modulation mit E2 (10⁻⁶ M) eine Zunahme der Aktivität im Vergleich zu derjenigen Aktivität, welche ohne Stimulation gemessen wurde. Diese zeigte sich jedoch erneut deutlich regredient nach Stimulation mit E2 (10⁻⁶ M) + ICI182-780. Die ER α cotransfizierten Zellen zeigen interessanterweise eine Abnahme der Aktivität unter Stimulation mit E2 (10⁻⁶ M) im Vergleich zu den Messungen ohne Stimulation. Des Weiteren zeigt sich ein erneuter deutlicher Anstieg nach Stimulation mit E2 (10⁻⁶ M) + ICI182-780. Im Bereich der ER β cotransfizierten Zellen sind keine großen Schwankungen in den Messungen nach unterschiedlicher Stimulation zu verzeichnen. Hier kommt es zu einem dezenten Anstieg der Aktivität nach Stimulation mit E2 (10⁻⁶ M) sowie einem erneuten Abfall nach Stimulation mit E2 (10⁻⁶ M) + ICI182-780 unterhalb der Messungen ohne Stimulation.

Ergebnisse

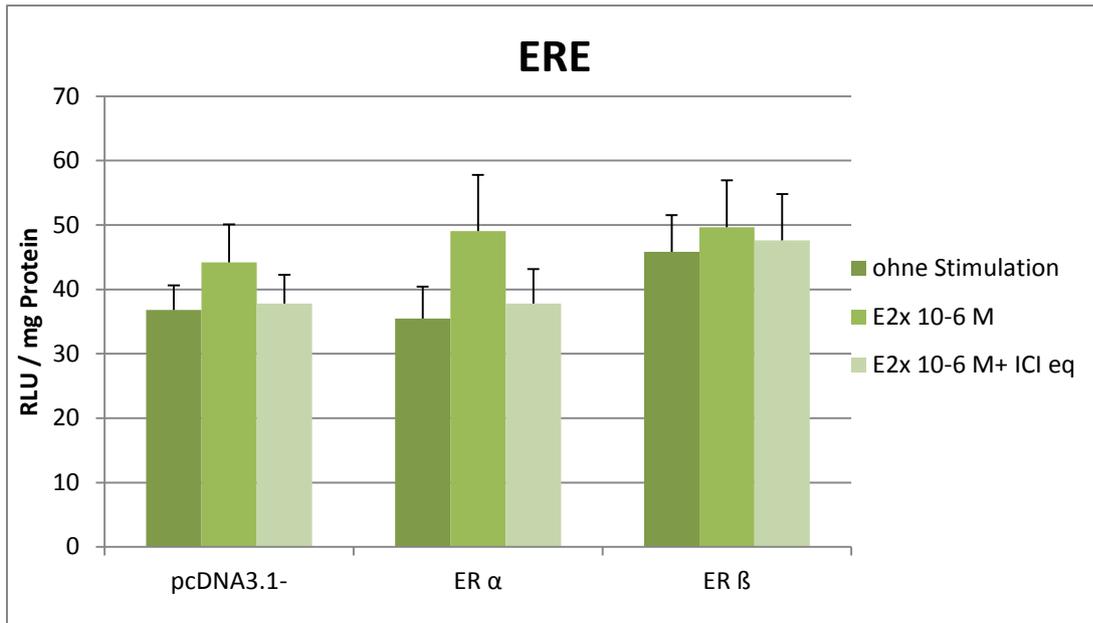


Abbildung 34 HEK Zellen transfiziert mit pGL4.14-ERE und cotransfiziert mit pcDNA3.1⁻, pcDNA3.1⁻-ERα und pcDNA3.1⁻-ERβ; 24 h Stimulation mit E2 und E2+ICI 182-780. (Die Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei Messpunkten gebildet).

Bei den Versuchen mit ERE transfizierten und mit pcDNA3.1⁻ cotransfizierten HEK Zellen zeigte sich zunächst eine dezente Aktivitätszunahme nach Modulation mit E2 (10⁻⁶ M), welche nach Modulation mit E2 (10⁻⁶ M) + ICI182-780 erneut regredient war. Die Grundaktivität der ERE transfizierten, ERα cotransfizierten HEK Zellen zeigte eine ähnliche Grundaktivität im Vergleich zu den pcDNA3.1⁻ cotranfizierten Zellen. Die ERα cotransfizierten Zellen zeigen jedoch eine deutliche Steigerung unter Stimulation mit E2 (10⁻⁶ M) und einen erneuten Rückgang unter Modulation mit E2 (10⁻⁶ M) + ICI182-780. Bei Cotransfektion mit ERβ zeigte sich eine deutlich erhöhte Grundaktivität der ERE-transfizierten Zellen ohne weitere Stimulation. Allerdings ließ sich auch feststellen, dass die Aktivität sich im Verlauf nach Modulation mit E2 (10⁻⁶ M) und E2 (10⁻⁶ M) + ICI182-780 nicht wesentlich veränderte. Es zeigt sich jedoch eine dezente Aktivitätszunahme unter Modulation mit E2 (10⁻⁶ M) und ein erneuter Rückgang unter Modulation mit E2 (10⁻⁶ M) + ICI182-780.

Ergebnisse

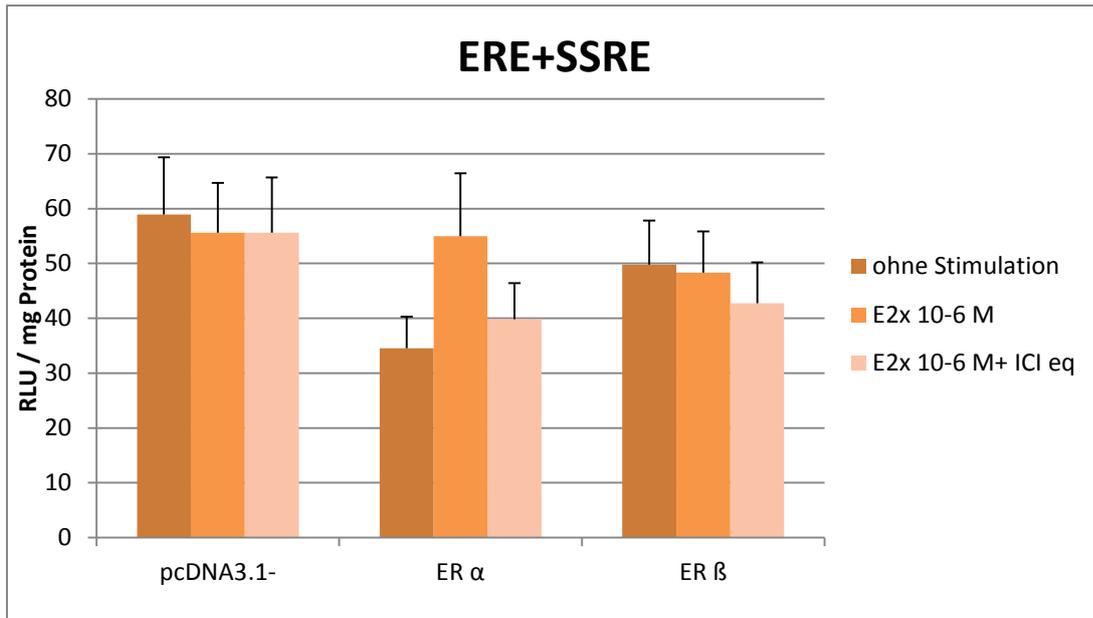


Abbildung 35 HEK Zellen transfiziert mit pGL4.14ERE+SSRE und cotransfiziert mit pcDNA3.1⁻, pcDNA3.1⁻-ERα und pcDNA3.1⁻-ERβ; 24h- Stimulation mit E2x10⁻⁶ M und E2x10⁻⁶ M + ICI 182-780 (Die Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei Messpunkten gebildet)

Bei den Versuchen an ERE+SSRE transfizierten HEK Zellen zeigte sich zunächst im Bereich der mit pcDNA3.1⁻ cotransfizierten Zellen in allen Modulationen eine deutlich erhöhte Aktivität im Vergleich zu den ERα- und ERβ cotransfizierten Zellen. Hierbei ist eine dezente Aktivitätsminderung bei den Stimulationen mit E2 (10⁻⁶ M) und E2 (10⁻⁶ M) + ICI182-780 zu bemerken. Bei den mit ERα cotransfizierten Zellen zeigte sich erwartungsgemäß eine Aktivitätszunahme der Zellen unter Stimulation mit E2 (10⁻⁶ M) sowie ein erneuter Abfall unter Stimulation mit E2 (10⁻⁶ M) + ICI182-780. Die mit ERE+SSRE transfizierten und ERβ cotransfizierten HEK Zellen zeigten eine höhere Grundaktivität ohne Stimulation als unter Stimulation mit E2 (10⁻⁶ M) und E2 (10⁻⁶ M) + ICI182-780. Hierbei kommt es unter Stimulation mit E2 zunächst zu einem dezenten Abfall der gemessenen Aktivität, welche unter Stimulation mit E2 (10⁻⁶ M) + ICI182-780 erneut dezent ansteigt.

5 Diskussion

Wie bereits in der Einleitung ausführlich beschrieben interagieren in unserem Knochen unterschiedliche Zellen miteinander, welche sich über verschiedene Signalwege gegenseitig beeinflussen können. Wir wissen heute Näheres über die Mechanotransduktion im Knochen mit seinen unterschiedlichen Signalwegen und Mechanorezeptoren; insbesondere über die Signalwege beim Knochenaufbau und Knochenabbau. Von besonderem Interesse ist hierbei die Bedeutung der Sexualhormone in Bezug auf den Knochenaufbau, vor allem die Östrogene mit ihren Östrogenrezeptoren α und β . Es konnten bislang unterschiedliche Signalwege eruiert werden, durch welche es über Mechanotransduktion möglich ist, auf Genexpressionsebene zu regulieren. Es wurden bereits multiple Untersuchungen bezüglich der Mechanosensitivität der Östrogenrezeptoren sowie der Auswirkung von Östrogenen auf die Genexpression durchgeführt. Während der ER α in den letzten Jahrzehnten intensiv erforscht und seine Rolle näher spezifiziert werden konnte, wissen wir heute über den ER β und seine Rolle im Bereich der Mechanotransduktion deutlich weniger. Ebenso ist bis zum heutigen Zeitpunkt die Wirkung der verschiedenen Östrogenrezeptoren aufeinander und somit der Einfluss, den die Rezeptoren aufeinander ausüben, noch nicht endgültig geklärt.

Wie bereits unter 1.2.2.1.2 ausgeführt, postulieren Saxon et al. (Saxon et al., 2007) im Rahmen der antimechanostatischen Theorie, dass die Signalübertragung über den ER α zu einer erhöhten Mechanosensitivität des Knochens führt, während der Signalweg über den ER β die Knochenbildung nach Dehnung hemmt und somit antimechanostatisch wirkt.

Auch Böttner et al. und Lindberg et al. postulierten, dass ER β eine antagonisierende Wirkung auf ER α hat sowie auch die ER α modulierte Gentranskription modulieren kann (Böttner, Thelen, & Jarry, 2014; Lindberg et al., 2003). Sie vermuten, dass die ER α /ER β Ratio die Sensitivität der Zellen und die biologische Antwort der Zelle auf Östrogene determiniert. Im Rahmen der Untersuchung der Wirkung von Vibration im Hinblick auf die Knochenheilung bei älterem, osteoporotischem, frakturiertem Knochen im Mausmodell postulierten Wehrle et al., dass ER β die negativen Effekte bzgl. der Knochenheilung durch Hemmung des osteoanabolen Wnt/ β Catenin Signalweges vermittelt, wohingegen ER α aufgrund einer Hochregulation des ER α bei unveränderter Regulation des ER β die osteoanabole Antwort vermittelt (Esther Wehrle et al., 2015). Die Bedeutung des ER und Wnt Signalweges in Bezug auf die Mechanotransduktion

hatten auch bereits Liedert et al. und Galea et al. beschrieben (Galea et al., 2013; Liedert et al., 2010). Im Rahmen dieser Versuche in Bezug auf die Bedeutung von Vibration zeigte sich der positive Effekt der Vibration jedoch im Speziellen bei ovariectomierten Mäusen; bei Östrogensubstitution oder erhaltener Ovarfunktion konnte kein wesentlicher Benefit gezeigt werden (Esther Wehrle et al., 2015).

Insbesondere vergleichende Versuche an Zellen, die den ER α und β exprimieren im Vergleich zu Zellen, welche nur den ER α exprimieren, ließen auch die Theorie von Mödder (Mödder, 2010) weiter untersuchen, welche besagt, dass ER β alleine nur eine unwesentliche Rolle im Rahmen des Knochenaufbaus spielt und die entscheidende Rolle des ER β in der Regulation der Aktivität des ER α liegt. Hierbei wäre auch interessant, die einzelnen Isoformen des ER β zu betrachten. Ogawa et al. (Ogawa et al., 1998) beschrieben, wie ER β 2 über ein ERE Reporter-Gen die Liganden-induzierte ER α Transkriptionsaktivität hemmt, Zhao et al. (C. Zhao et al., 2007) beschrieben die Unterdrückung ER α regulierter Gene, unter anderem über die Bildung von ER α /ER β 2 Heterodimeren. Es sind also auch innerhalb der unterschiedlichen Isoformen und der Polymorphismen des ER β noch viele Fragen offen.

Anliegen dieser Arbeit war es, die Wirkungen der Östrogenrezeptoren in Bezug auf die Mechanosensitivität zu eruieren und hierbei ein besonderes Augenmerk auf etwaige Unterschiede in der Wirkung des ER α und β zu legen. Für die Versuche stand mir eine stabile Zelllinie mit ER α Überexpression zur Verfügung. Die Herstellung einer stabilen Zelllinie, die den ER β überexprimiert, war eines der Ziele dieser Arbeit, um mit beiden Zelllinien arbeiten und somit die zwei Östrogenrezeptoren im Hinblick auf ihre Rolle bei der Mechanotransduktion vergleichen zu können.

5.1. Probleme bei der Herstellung von Tools

5.1.1 ER α

Zunächst wurden unterschiedliche Versuche an der stabilen Zelllinie, die den ER α überexprimiert, durchgeführt, um die Genexpression des ER α nach Modulation mit Östrogenen und Antiöstrogenen in unterschiedlicher Konzentration zu untersuchen (siehe auch 3.9.3). Da sich in der zunächst durchgeführten Sequenzierung jedoch

zeigte, dass die bestehenden ER α Sequenzen mehrere Fehler aufwiesen, wurden zunächst durch basenspezifische Mutationen die entsprechenden Stellen verändert, sodass letztendlich eine ER α Sequenz entstand, die frei von Mutationen war. Dies konnte anhand einer Sequenzierung bewiesen werden. Anhand dieser Sequenz konnten Versuche gestartet werden, mit dem Ziel eine Zelllinie mit ER α Überexpression als neues Tool zu schaffen.

5.1.2. Herstellung einer stabilen Zelllinie mit ER β Überexpression

Um die Funktion von ER α und ER β in der Mechanotransduktion parallel zu untersuchen, war eines der Ziele dieser Arbeit die Etablierung eines neuen Tools im Sinne einer stabilen Zelllinie, die den ER β überexprimiert. Auf dem Boden beider stabiler Zelllinien mit Überexpression der Östrogenrezeptoren α und β wollten wir Versuche durchführen, bei denen ein gegebenenfalls unterschiedliches Verhalten beobachtet werden sollte. Im Rahmen der Herstellung eines Tools zur Analyse der ER β -vermittelten Mechanoresponsivität wurden uns in Zusammenarbeit mit der Universitäts-Frauenklinik Würzburg Endometriumzellen zur Verfügung gestellt. Die Versuche der Amplifikation der ER β cDNA blieben jedoch erfolglos. Es stellte sich heraus, dass es trotz Austestung unterschiedlicher ER β -Primer und der Ausschöpfung aller Möglichkeiten in Bezug auf die Varianz der PCR-Bedingungen nicht möglich war, eine erfolgreiche PCR durchzuführen. Hierbei wurde auch versucht, über die Verwendung unterschiedlicher Taq- und Pfu-Polymerasesysteme eine Verbesserung der Bedingungen herbeizuführen. Auch wurden die PCRs an unterschiedlichen PCR-Maschinen wie beispielsweise dem OPTICON durchgeführt, um eine Optimierung der Bedingungen zu erreichen. Auch die durchgeführten Sequenzierungen zeigten keine eindeutigen, positiven Ergebnisse, sodass man letztendlich nicht sicher feststellen konnte, ob ER β in den verwendeten Zellen exprimiert wird.

Um schließlich mit den Klonierungsarbeiten am ER β beginnen zu können, wurde ein ER β Klon bei imaGenes bestellt, der als Vektor den pBluescriptR aufwies. Der Leervektor hatte eine Größe von 2998 bp, das Insert bestand aus der cDNA für ER β .

Diese Sequenz wurde letztendlich nach Umklonierung in einen Überexpressionsvektor dazu benutzt, mittels Elektroporation eine stabile Zelllinie zu schaffen. Man muss feststellen, dass die Überprüfung der Zellen bezüglich einer ER β Expression mittels Sequenzierung zu Beginn der Versuche intensiver hätte durchgeführt werden müssen.

Man hätte gegebenenfalls auf Zellen in anderen Organen ausweichen können, in denen der ER β bekannt ist, so beispielsweise der Lunge, des Urogenitaltraktes oder des kardiovaskulären Systems.

5.2 Auswirkungen der Östrogenrezeptoren und von Östradiol auf die Mechano-transduktion und Interaktion von ER α und ER β

Die Versuche, welche nun folgend diskutiert werden sollen, wurden durchgeführt, um die eingangs erwähnte Frage nach dem Einfluss der Östrogene auf die einzelnen Östrogenrezeptoren und die damit verbundene Regulation auf Genebene sowie dem Verhalten der verschiedenen Östrogenrezeptoren aufeinander weiter zu untersuchen.

5.2.1 Modulation von ER α - und ER β -Zellen mittels Östrogen und Antiöstrogen (siehe auch 4.2.1)

Die Modulation von ER α - und ER β -Zellen erfolgte mittels Östrogenen und Antiöstrogenen in unterschiedlichen Konzentrationen. Anschließend erfolgte die Überprüfung der Genexpression von ER α und ER β mittels PCR. Hierbei konnte nach Durchführung zahlreicher Versuche kein eindeutiges Verhalten der hMSC-TERT-ER α -Zellen auf die jeweils unterschiedliche Modulation erkannt werden. Da die hMSC-TERT-Zellen eine basale Expression des ER α besitzen, kam es teilweise auch bereits ohne Stimulation zu einer Detektion der ER α -Expression. Ein typisches Ergebnis in vielen Versuchsergebnissen war eine Expressionssteigerung des ER α bei Modulation mit E2 (10^{-6} M) und mit E2 (10^{-8} M) +ICI182-870. Eine Hochregulation der ER α -Expression bei Modulation mit E2 (10^{-6} M) hatten wir erwartet. Bei gleichzeitiger Modulation mit Östrogen und Antiöstrogen jedoch hatten wir nicht mit einer Aktivitätszunahme gerechnet, da wir davon ausgingen, dass Antiöstrogene dem Effekt des Östrogens entgegenwirken würden.

Bezüglich des ER β zeigten sich die Ergebnisse nach Modulation eindeutiger. Unter Modulation mit E2 (10^{-6} M) und E2 (10^{-8} M) kam es zu einer Hochregulation der Expression, während sich nach Modulation mit E2 (10^{-6} M) + ICI182870 (10^{-6} M) zunächst etwas und nach Modulation mit E2 (10^{-8} M) + ICI182870 (10^{-8} M) deutlich eine Aktivitätsminderung einstellte. Diese Ergebnisse unterstützen die Aussage, dass die Aktivität der Östrogenrezeptoren bei Stimulation durch Östradiol erhöht wird.

Die Versuche zeigten letztendlich, dass zum einen die jeweilige stabile Expression nicht sehr stark sein konnte und zum anderen die endogene Expression wesentlich auf exogene Steroide reagierte, was sich im Sinne der geplanten Experimente sehr störend auswirkte. Die Zellen wurden daher im Folgenden nicht weiter analysiert, wir gingen auf transiente Überexpressionsversuche in anderen Gastzellen über.

5.2.2 Effekte der transienten Überexpression von ER α und ER β auf die Luciferaseaktivität Östrogen-responsiver Elemente (siehe auch 4.2.3)

Bezüglich der transienten Transfektion von HEK293-Zellen zeigte sich bei den Versuchen mit dem transfizierten Luciferase Leervektor pGL4.14 ein unerwartetes Ergebnis. Hier zeigten die mit ER β cotransfizierten HEK293-Zellen eine Aktivitätserhöhung unter Modulation mit Östrogenen, während sich dieser Effekt nach Zugabe von Antiöstrogenen erneut abschwächte. Dieser Effekt konnte bei den mit ER α transfizierten Zellen nicht nachgewiesen werden, denn hier zeigte die Modulation mit Östrogenen unerwartet eine Aktivitätsminderung. Dies deutet darauf hin, dass im Leervektor kryptische responsive Bindungsstellen für ER β , jedoch nicht für ER α vorhanden sind. Dieses Verhalten änderte sich bei den mit pGL4.14-ERE transfizierten Zellen und bestätigte hier die Aussage, dass ERE eine zusätzliche Aktivitätszunahme bei Vorhandensein von Östrogenen bewirkt.

Das unterschiedliche Verhalten der mit ER α und ER β transfizierten Zellen in diesen Versuchen unterstützt die Hypothese, dass die beiden Östrogenrezeptoren unterschiedliche Funktionen und Wirkungsweisen haben. Die jedoch von Ogawa et al. (Ogawa et al., 1998) postulierte Hypothese, dass der ER β über Östrogen-responsive Elemente (ERE) die ligandeninduzierte Transkriptionsaktivität des ER α hemmt, kann in unseren Versuchen nicht vollständig nachvollzogen werden. Die Versuche an mit ER β cotransfizierten HEK-Zellen zeigen keine Aktivitätsminderung im Vergleich zu den mit ER α cotransfizierten HEK-Zellen. Lediglich bei den Versuchen mit ERE+SSRE cotransfizierten HEK-Zellen zeigt sich nach Modulation mit Östrogenen eine Aktivitätsminderung der ER β cotransfizierten HEK-Zellen im Vergleich zu den ER α cotransfizierten HEK-Zellen.

Diese Ergebnisse bestätigen die bisherigen Erkenntnisse, dass ER α und ER β teils sehr unterschiedliche Aufgaben und Wirkungen aufweisen. Weiterhin kann man durch diese Ergebnisse darauf schließen, dass die ERE- und ERE-SSRE-Elemente im pGL4.14 Vektor funktionell sind.

Die hier diskutierten Ergebnisse führten zu der Einschätzung, dass im Leervektor bereits unerwartet kryptische responsive Elemente vorlagen, die auf basale Modulation mit Hormonen und Hormonantagonisten reagierten, so dass die weitere Analyse der Vektoren mit den responsiven Elementen zwar Hinweise auf deren Aktivität erbrachte, die quantitative Wertung der Ergebnisse jedoch immer durch die Unsicherheit der störenden kryptischen Elemente im Konstrukt erschwert wurde. Die Suche nach einem geeigneten Leervektor musste somit weitergehen, was jedoch den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätte und somit den weiterführenden Arbeiten im Labor überlassen blieb.

5.3 Dehnungsversuche

5.3.1 Ergebnisse der mechanischen Stimulation von primären MSC nach Transduktion von lentiviralen mechanoresponsiven Luciferase-Reporter-Konstrukten (siehe auch 4.2.2.3)

Die Versuche wurden unter Verwendung von Konstrukten mit mechanosensitiven responsiven Elementen durchgeführt, die die Luciferase-Expression beeinflussen. Hierbei zeigte sich, dass die AP1- und SP1-responsiven Elemente durch zyklische Dehnung induziert wurden, nachdem zyklisch Dehnung den stabilen hMSC-TERT zugefügt worden war, bzw. konnte ebenso gezeigt werden, dass zyklische Dehnung die lentiviral transduzierten SP1- und AP1-responsiven Elemente in primären hMSC induziert. Die spezielle AP-1-Induktion konnte durch die Beigabe von Verapamil, einem Ca^{2+} -Kanal-Blocker, vollständig blockiert werden, was dafürspricht, dass ein Kalziumeinstrom für die Mechanotransduktion und die nukleäre Translokation des AP-1-Komplexes unbedingt notwendig ist. Mit den geschaffenen hMSC-TERT-AP1- und hMSC-TERT-SP1-Zelllinien wurde ein neues Tool geschaffen, mit welchem in Zukunft möglicherweise „Mechanosensitizer“ bzw. „Mechanoinhibitoren“ im Rahmen der Mechanotransduktion getestet werden können. Nach Abschluss dieser Arbeit wurden diese Konstrukte auch im Folgenden bei verschiedenen Problemstellungen als Werkzeuge verwendet und trugen zur erfolgreichen Publikation der Ergebnisse bei (L. Seefried, S. Mueller-Deubert, et al., 2010).

Die Konstrukte mit ERE und ERE+SSRE als responsive Elemente erwiesen sich in den ersten Versuchen ebenfalls als mechanoresponsiv, allerdings im Sinne einer

Hemmung der Aktivität. Dies eröffnete die interessante Möglichkeit, dass östradiolabhängige transkriptionelle Aktivität durch Mechanotransduktion unter bestimmten Umständen hemmend auf die Expression bestimmter Zielgene wirkte. Sofern diese Hemmung anabol wirksame Prinzipien beträfe, würden sich molekulare Zusammenhänge gerade auch im Sinne der negativen Auswirkungen von Vibration auf die Knochenheilung bei hormonkompetenten Mäusen erklären lassen (E. Wehrle et al., 2014). Sofern die Repression ein inhibitorisches Protein wie z.B. Sclerostin beträfe, könnte sich hingegen ein anaboler Effekt auch durch Repression erklären lassen. Um aber diesen Überlegungen näherzukommen, mussten die einzelnen Komponenten wie ER α/β -Expression durch genetisches Engineering in den jeweiligen Zelllinien kontrollierbar dargestellt werden, was letztlich durch die Probleme der Herstellung stabil exprimierender Zellen zunächst verhindert wurde. Im Folgenden soll dies noch einmal etwas ausführlicher diskutiert werden.

5.3.2 Charakterisierung der stabilen mechanoresponsiven AP1-, SP1-, SP1-SSRE- und ERE-SSRE-Zelllinien (siehe auch 4.2.2.1)

Wie bereits unter 4.2.2.1 beschrieben zeigten sich bei den Versuchen mit den Reporterkonstrukten deutliche Aktivitätsunterschiede vor und nach Dehnung. Bei den Versuchen mit transfizierten AP-1, AP-1+SSRE und SP-1 kam es zu deutlichen Aktivitätszunahmen. Überraschend zeigte sich hierbei die eindeutige Aktivitätsminderung bei Transfektion mit ERE und ERE+SSRE, da wir bei ERE als Östrogen-responsivem Element eine Aktivitätszunahme erwartet hatten. Damit ist eine Responsivität der Elemente auf mechanische Stimulation aber jedenfalls dargestellt, die im oben diskutierten Sinne wirksam werden könnte. Die möglichen antagonistischen Aktivitäten der beiden klassischen Östrogenrezeptoren und nicht zuletzt auch die Möglichkeiten der Erhöhung der Komplexität durch membranassoziierte Rezeptoren erschweren die weitere Aufklärung jedoch erheblich.

Die Aussage von Levy et al. (Levy et al., 2008), dass die meisten Gene, die über ER α reguliert werden, über den nicht-klassischen Weg des genomischen Signalweges über Transkriptionsfaktoren moduliert werden und nur 11% ERE als responsives Element aufweisen, kann eine Erklärung dafür sein, warum sich in Versuchen ERE nicht immer eindeutig als aktivitätsfördernd zeigt. Des Weiteren kann die hier beobachtete Tatsache ein Hinweis darauf sein, dass die Östrogen-Wirkung hier vor allem über den nicht-genomischen Signalweg stattfindet, bei welcher EREs keine Rolle spielen. Laut

Diskussion

Kousteni et al. (Kousteni et al., 2001) erhöht Dehnung beim nicht-genomischen Signalweg die Anzahl der Zellen, die mit einer nukleären ERK-Akkumulation einhergehen um 100% und würde die beschriebenen Versuchsergebnisse in diesem Fall unterstützen. Es ist zudem theoretisch keineswegs auszuschließen, dass über Östrogenrezeptoren im speziellen Promoterkontext auch repressive Aktivität vermittelt wird, die durch Mechanotransduktion unterstützt wird. Wenn die Unterdrückung der RANKL-Produktion eine mechanoresponsive Komponente beinhaltet, wäre dies eine solche Situation.

Die Ergebnisse könnten im klinischen Alltag insbesondere bei der nicht-postmenopausalen Osteoporose von Interesse sein, sollte sich weiterhin bestätigen, dass ER β als negativer Modulator fungiert und hier eine selektive Blockade des ER β medikamentös erreicht werden kann. Im Rahmen der Therapie der postmenopausalen Osteoporose ist der Effekt interessant, da hier ja ein Defizit an Östrogenen zugrundeliegt und im Rahmen der hormonellen Substitution von Interesse wäre, lediglich den ER α zu aktivieren. Die Ergebnisse im Rahmen der Dehnungsversuche unterstützen weiterhin die Theorie, dass Dehnung im klinischen Sinne von Mobilisation, Kraft- und Dehnungsübungen sowie Vibrationstraining weiterhin eine große Rolle bei der Prävention und Behandlung der Osteoporose spielt und im Rahmen der klinischen Therapie unbedingt umgesetzt werden sollte.

Im Bereich Mechanotransduktion sind noch viele Fragen ungeklärt, nicht zuletzt die Fragen der Frequenz und Amplitude von Dehnungsreizen, die physiologisch sind und solcher, die ggf. pathologische Auswirkungen haben. Weitere Untersuchungen der molekularen Effekte von Östrogenrezeptoren und ihrer spezifischen Liganden sollten klären, in welchen Situationen eine Therapie mit Krafteinleitung z.B. durch Vibration für die Knochenregeneration unterstützend oder gar hemmend wirkt. Frakturheilungsmodelle können hierbei eine wichtige Rolle spielen. Diese Untersuchungen erscheinen umso wichtiger als sich bereits viele Geräte auf dem Markt befinden, deren Effekt im Individualfall (z.B. Unterschiede zwischen Prä- und Postmenopause) nur schlecht überprüft ist (Esther Wehrle et al., 2015; E. Wehrle et al., 2014).

6 Zusammenfassung

Die molekulare Klärung der Einflüsse von ER α und β ist unverändert von großer klinischer Bedeutung. Die Herstellung stabiler Zelllinien mit Überexpression von Reporter-genkonstrukten und Rezeptoren kann dabei hilfreich sein. In dieser Arbeit wurde eine stabile Zelllinie mit Überexpression von ER β etabliert, und die Effekte von zyklischer Dehnung auf Reporter-genexpression unter der Kontrolle von mechanosensitiven responsiven Elementen wurden charakterisiert. Das verwendete System der Dehnung von Zellen *in-vitro* war bezogen auf die Untersuchung der bekanntermaßen mechano-responsiven Transkriptionsfaktor-Komplexe AP-1 und SP-1 funktionell, und erste Ergebnisse konnten auch zeigen, dass Östrogen-Rezeptor-responsive DNA-Elemente tatsächlich auf Dehnung von Zellen ansprechen. Die charakterisierten Elemente hatten dabei eine hemmende Wirkung. Diese Erkenntnis kann für zukünftige Forschung verwendet werden und ist sehr hilfreich bei der zukünftigen Herstellung von molekularbiologischen Werkzeugen zur Untersuchung der Einflüsse weiblicher Sexualhormone auf die Mechanotransduktion. Der Versuch, das komplexe Regelwerk der Östrogen-vermittelten Genregulation durch „genetic engineering“ nachzustellen trifft jedoch auf unerwartet viele technische Probleme. Im Rahmen der Manöverkritik des Vorgehens bei der Herstellung solcher Tools muss festgestellt werden, dass die molekulare Überprüfung der hergestellten Werkzeuge in vielfacher Hinsicht offenbar nicht intensiv genug sein kann und dass bestimmte Fehlermöglichkeiten nach jedem Schritt erneut hinterfragt werden müssen. Verwendete Vektor-Sequenzen können durch kryptische hormonresponsive Elemente die geplanten Experimente unmöglich machen, inserierte Sequenzen können immer wieder Mutationen aufnehmen und die Effekte des „genetic engineering“ können im Lauf der experimentellen Verfahren auch wieder verloren gehen. Die Rolle von Östrogen-responsiven Elementen konnte in unseren Versuchen in Verbindung mit Mechanotransduktion zwar im Prinzip eindeutig nachvollzogen werden, zukünftige Forschung wird jedoch noch viele weiteren Schritte benötigen, um die unterschiedlichen Komplexitätsebenen der Steroidhormon-Wirkung aufzuklären. Allein die Ergebnisse am Versuchstier zu den negativen versus positiven Auswirkungen von Ganzkörpervibration auf die Knochenheilung in Anwesenheit respektive Abwesenheit weiblicher Sexualhormone sprechen dafür, dass die hormonelle Modulation der Effekte von Training auf den Knochen von großer klinischer Bedeutung ist. Der Verlust der Produktion von Sexualhormonen in der Menopause der Frau ist einer

Zusammenfassung

der wichtigsten Risikofaktoren für die Osteoporose. Östrogenrezeptoren sind unverändert sehr geeignete Targets für die Entwicklung von Medikamenten wie z.B. die selektiven Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERMs), die sehr spezifisch designt werden können bezüglich der Rezeptor-Spezifität und der Änderung der Rezeptor-Konfiguration. Die Überprüfung der Auswirkungen der jeweiligen Designer-Steroide auf die Mechanotransduktion und damit das Ansprechen der Gewebe auf Training und Bewegung sollte dabei unbedingt mitberücksichtigt werden.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AF-1 und 2	Aktivierungsfunktion 1 und 2
AP-1	activator protein 1
AS	Aminosäure
BMD	bone mineral density
BMP	bonemorphogenetic proteins
BMU	bone multicellular unit
bp	Basenpaare
COX-2	Cyclooxygenase-2
CSF-1	macrophage colony stimulating factor
DBD	DNA bindende Domäne
DEXA	Dual-Energy-X-Ray-Absorptiometrie
DHT	Dihydrotestosteron
DXA	Dual-X-Ray-Absorptiometrie
E2	Östradiol
ERE	estrogen response element
ESR	Östrogenrezeptor
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
HEK 293	human embryonic kidney cells (menschliche embryonale Nierenzellen)
ICI 182,780	Fulvestrant (Antiöstrogen)
IGF-1, -2	insulinlike growth factor-1 u. -2
IL	Interleukin
LBD	Ligandenbindende Domäne
LB- Medium	lysogeny broth
LRP	lipoprotein-related proteins
MSC	mesenchymal stem cells (mesenchymale Stammzellen)
NF κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO	nitric oxide (Stickstoffoxid)

Abkürzungsverzeichnis

o.n.	over night
OPG	Osteoprotegerin
PDGF	platelet derived growth factor
Pen/ Strep	Penicillin und Streptomycin
PGE	Prostaglandin
PKC	Proteinkinase C
PLA	Phospholipase A
PPAR	peroxisome-proliferator and activating receptor
RANK	receptor activator of NF- κ B
RANKL	receptor activator of NF- κ B Ligand
RT	Reverse Transkriptase
SD	standard deviation
SP1	specificity protein-1
SRC	Steroidrezeptor-Koaktivator Genfamilie
SS	single strand
SSRE	shear stress response element
Tab.	Tabelle
TERT	telomerase reverse transcriptase
TGF- β	transforming growth factor- β
TNF- α	tumornecrosis factor α
WHO	World Health Organisation

8 Literaturverzeichnis

- Aarden, E. M., Nijweide, P. J., & Burger, E. H. (1994). Function of osteocytes in bone. *Journal of Cellular Biochemistry*, *55*(3), 287-299. doi:10.1002/jcb.240550304
- Acconcia, F., Bocedi, A., Ascenzi, P., & Marino, M. (2003). Does palmitoylation target estrogen receptors to plasma membrane caveolae? *IUBMB Life*, *55*(1), 33-35. doi:10.1080/1521654031000081256
- Agarwal, S., Long, P., Seyedain, A., Piesco, N., Shree, A., & Gassner, R. (2003). A central role for the nuclear factor-kappaB pathway in anti-inflammatory and proinflammatory actions of mechanical strain. *FASEB J*, *17*(8), 899-901. doi:10.1096/fj.02-0901fje
- Aguirre, J. I., Plotkin, L. I., Gortazar, A. R., Millan, M. M., O'Brien, C. A., Manolagas, S. C., & Bellido, T. (2007). A novel ligand-independent function of the estrogen receptor is essential for osteocyte and osteoblast mechanotransduction. *J Biol Chem*, *282*(35), 25501-25508. doi:10.1074/jbc.M702231200
- Aguirre, J. I., Plotkin, L. I., Stewart, S. A., Weinstein, R. S., Parfitt, A. M., Manolagas, S. C., & Bellido, T. (2006). Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J Bone Miner Res*, *21*(4), 605-615. doi:10.1359/jbmr.060107
- Ajubi, N. E., Klein-Nulend, J., Alblas, M. J., Burger, E. H., & Nijweide, P. J. (1999a). Signal transduction pathways involved in fluid flow-induced PGE2 production by cultured osteocytes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *276*(1), E171-E178. doi:10.1152/ajpendo.1999.276.1.E171
- Ajubi, N. E., Klein-Nulend, J., Alblas, M. J., Burger, E. H., & Nijweide, P. J. (1999b). Signal transduction pathways involved in fluid flow-induced PGE2 production by cultured osteocytes. *Am J Physiol*, *276*(1 Pt 1), E171-178.
- Bacabac, R. G., Smit, T. H., Mullender, M. G., Dijcks, S. J., Van Loon, J. J. W. A., & Klein-Nulend, J. (2004). Nitric oxide production by bone cells is fluid shear stress rate dependent. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *315*(4), 823-829. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.01.138>
- Bardin, A., Boulle, N., Lazennec, G., Vignon, F., & Pujol, P. (2004). Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer*, *11*(3), 537-551.
- Beato, M., Herrlich, P., & Schutz, G. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell*, *83*(6), 851-857.
- Benninghoff, A., & Drenckhahn, D. (2008). *Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie Band 1: Zelle, Gewebe, Entwicklung, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem* (A. Benninghoff Ed. 17. Auflage ed.). Stuttgart: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag.
- Bord, S., Horner, A., Beavan, S., & Compston, J. (2001). Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone. *J Clin Endocrinol Metab*, *86*(5), 2309-2314. doi:10.1210/jcem.86.5.7513
- Böttner, M., Thelen, P., & Jarry, H. (2014). Estrogen receptor beta: Tissue distribution and the still largely enigmatic physiological function. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *139*, 245-251. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.03.003>
- Boyle, W. J., Simonet, W. S., & Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, *423*(6937), 337-342. doi:10.1038/nature01658

- Burger, E. H., Klein-Nulend, J., & Smit, T. H. (2003). Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon--a proposal. *J Biomech*, 36(10), 1453-1459.
- Burger, E. H., Klein-Nulend, J., & Smit, T. H. (2003). Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon—a proposal. *Journal of Biomechanics*, 36(10), 1453-1459. doi:[https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(03\)00126-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(03)00126-X)
- Byers, M., Kuiper, G. G., Gustafsson, J. A., & Park-Sarge, O. K. (1997). Estrogen receptor-beta mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins. *Mol Endocrinol*, 11(2), 172-182. doi:10.1210/mend.11.2.9887
- Canalis, E. (2010). New treatment modalities in osteoporosis. *Endocr Pract*, 16(5), 855-863. doi:10.4158/ep10048.ra
- Carroll, J. S., & Brown, M. (2006). Estrogen receptor target gene: an evolving concept. *Mol Endocrinol*, 20(8), 1707-1714. doi:10.1210/me.2005-0334
- Chambliss, K., Yuhanna, I., Mineo, C., Liu, P., German, Z., Sherman, T., . . . Shaul, P. (2000). Estrogen Receptor and Endothelial Nitric Oxide Synthase Are Organized Into a Functional Signaling Module in Caveolae. *Circulation research*, 87, E44-52. doi:10.1161/01.RES.87.11.e44
- Chambliss, K. L., Yuhanna, I. S., Anderson, R. G., Mendelsohn, M. E., & Shaul, P. W. (2002). ERbeta has nongenomic action in caveolae. *Mol Endocrinol*, 16(5), 938-946. doi:10.1210/mend.16.5.0827
- Chambliss, K. L., Yuhanna, I. S., Mineo, C., Liu, P., German, Z., Sherman, T. S., . . . Shaul, P. W. (2000). Estrogen receptor alpha and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae. *Circ Res*, 87(11), E44-52.
- Chang, E. C., Frasor, J., Komm, B., & Katzenellenbogen, B. S. (2006). Impact of estrogen receptor beta on gene networks regulated by estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Endocrinology*, 147(10), 4831-4842. doi:10.1210/en.2006-0563
- Cherian, P. P., Siller-Jackson, A. J., Gu, S., Wang, X., Bonewald, L. F., Sprague, E., & Jiang, J. X. (2005). Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol Biol Cell*, 16(7), 3100-3106. doi:10.1091/mbc.E04-10-0912
- Compston, J. (2010). Management of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Nature Reviews Rheumatology*, 6(2), 82-88. doi:10.1038/nrrheum.2009.259
- Dahlman-Wright, K., Cavailles, V., Fuqua, S. A., Jordan, V. C., Katzenellenbogen, J. A., Korach, K. S., . . . Gustafsson, J. A. (2006). International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev*, 58(4), 773-781. doi:10.1124/pr.58.4.8
- Dang, Z. C., van Bezooijen, R. L., Karperien, M., Papapoulos, S. E., & Lowik, C. W. (2002). Exposure of KS483 cells to estrogen enhances osteogenesis and inhibits adipogenesis. *J Bone Miner Res*, 17(3), 394-405. doi:10.1359/jbmr.2002.17.3.394
- David, J. P., & Schett, G. (2010). TNF and bone. *Curr Dir Autoimmun*, 11, 135-144. doi:10.1159/000289202
- Duncan, R. L., & Turner, C. H. (1995). Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int*, 57(5), 344-358.
- Faßbender, W. (2006). *Evidenzbasierte Therapie der Osteoporose* (Vol. 1): Uni-Med Verlag Ag.

- Feng, T., Szabo, E., Dziak, E., & Opas, M. (2010). Cytoskeletal disassembly and cell rounding promotes adipogenesis from ES cells. *Stem Cell Rev Rep*, 6(1), 74-85. doi:10.1007/s12015-010-9115-8
- Frenkel, B., Hong, A., Baniwal, S. K., Coetzee, G. A., Ohlsson, C., Khalid, O., & Gabet, Y. (2010). Regulation of adult bone turnover by sex steroids. *J Cell Physiol*, 224(2), 305-310. doi:10.1002/jcp.22159
- Galea, G. L., Meakin, L. B., Sugiyama, T., Zebda, N., Sunters, A., Taipaleenmaki, H., . . . Price, J. S. (2013). Estrogen receptor α mediates proliferation of osteoblastic cells stimulated by estrogen and mechanical strain, but their acute down-regulation of the Wnt antagonist Sost is mediated by estrogen receptor β . *J Biol Chem*, 288(13), 9035-9048. doi:10.1074/jbc.M112.405456
- Genetos, D. C., Geist, D. J., Liu, D., Donahue, H. J., & Duncan, R. L. (2005). Fluid shear-induced ATP secretion mediates prostaglandin release in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 20(1), 41-49. doi:10.1359/jbmr.041009
- Gustafsson, J. A. (1999). Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol*, 163(3), 379-383.
- Hamdy, N. A. (2009). Strontium ranelate improves bone microarchitecture in osteoporosis. *Rheumatology (Oxford)*, 48 Suppl 4, iv9-13. doi:10.1093/rheumatology/kep274
- Harris, H. A. (2007). Estrogen receptor-beta: recent lessons from in vivo studies. *Mol Endocrinol*, 21(1), 1-13. doi:10.1210/me.2005-0459
- Herold, G. (2010). *Innere Medizin eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. Köln: Herold.
- Herrmann, M., Engelke, K., Ebert, R., Müller-Deubert, S., Rudert, M., Ziouti, F., . . . Jakob, F. (2020). Interactions between Muscle and Bone--Where Physics Meets Biology. *Biomolecules*, 10(3). doi:10.3390/biom10030432
- Hirata, S., Shoda, T., Kato, J., & Hoshi, K. (2001). The multiple untranslated first exons system of the human estrogen receptor beta (ER beta) gene. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 78(1), 33-40.
- Hofbauer, L. C., Kuhne, C. A., & Viereck, V. (2004). The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 4(3), 268-275.
- Hughes-Fulford, M. (2004). Signal transduction and mechanical stress. *Sci STKE*, 2004(249), Re12. doi:10.1126/stke.2492004re12
- Jakob, F., Benisch, P., & Ebert, R. (2010). Pathophysiologie der Osteoporose. *Rheumamedizin*
- Johnson, M. L. (2004). The high bone mass family--the role of Wnt/Lrp5 signaling in the regulation of bone mass. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 4(2), 135-138.
- Karow, T., & Lang-Roth, R. (2010). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden 2010 ; [für Studium & Praxis ; Markierung der Prüfungsfakten des "Hammerexamens" bis 04/2009 ; Therapieempfehlungen deutscher und internationaler Fachgesellschaften ; umfassende Dosierungen]* (18. Aufl. ed.). Pulheim: Karow.
- Kemmler, W., Bebenek, M., Kohl, M., & von Stengel, S. (2015). Exercise and fractures in postmenopausal women. Final results of the controlled Erlangen Fitness and Osteoporosis Prevention Study (EFOPS). *Osteoporos Int*, 26(10), 2491-2499. doi:10.1007/s00198-015-3165-3
- Kemmler, W., Kohl, M., & von Stengel, S. (2017). Long-term effects of exercise in postmenopausal women: 16-year results of the Erlangen Fitness and

- Osteoporosis Prevention Study (EFOPS). *Menopause*, 24(1), 45-51. doi:10.1097/gme.0000000000000720
- Kimble, R. B., Matayoshi, A. B., Vannice, J. L., Kung, V. T., Williams, C., & Pacifici, R. (1995). Simultaneous block of interleukin-1 and tumor necrosis factor is required to completely prevent bone loss in the early postovariectomy period. *Endocrinology*, 136(7), 3054-3061. doi:10.1210/endo.136.7.7789332
- Kitazawa, R., Kimble, R. B., Vannice, J. L., Kung, V. T., & Pacifici, R. (1994). Interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein decrease osteoclast formation and bone resorption in ovariectomized mice. *J Clin Invest*, 94(6), 2397-2406. doi:10.1172/jci117606
- Kousteni, S., Bellido, T., Plotkin, L. I., O'Brien, C. A., Bodenner, D. L., Han, L., . . . Manolagas, S. C. (2001). Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell*, 104(5), 719-730.
- Kramer, I., Keller, H., Leupin, O., & Kneissel, M. (2010). Does osteocytic SOST suppression mediate PTH bone anabolism? *Trends Endocrinol Metab*, 21(4), 237-244. doi:10.1016/j.tem.2009.12.002
- Lazennec, G., Bresson, D., Lucas, A., Chauveau, C., & Vignon, F. (2001). ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology*, 142(9), 4120-4130. doi:10.1210/endo.142.9.8395
- Lee, M. H., Kwon, T. G., Park, H. S., Wozney, J. M., & Ryoo, H. M. (2003). BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Biophys Res Commun*, 309(3), 689-694.
- Leventhal, L., Brandt, M. R., Cummons, T. A., Piesla, M. J., Rogers, K. E., & Harris, H. A. (2006). An estrogen receptor-beta agonist is active in models of inflammatory and chemical-induced pain. *Eur J Pharmacol*, 553(1-3), 146-148. doi:10.1016/j.ejphar.2006.09.033
- Levin, E. R. (2002). Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids*, 67(6), 471-475.
- Levy, N., Tatomer, D., Herber, C. B., Zhao, X., Tang, H., Sargeant, T., . . . Leitman, D. C. (2008). Differential regulation of native estrogen receptor-regulatory elements by estradiol, tamoxifen, and raloxifene. *Mol Endocrinol*, 22(2), 287-303. doi:10.1210/me.2007-0340
- Lewandowski, S., Kalita, K., & Kaczmarek, L. (2002). Estrogen receptor beta. Potential functional significance of a variety of mRNA isoforms. *FEBS Lett*, 524(1-3), 1-5.
- Lewiecki, E. M. (2010). Denosumab--an emerging treatment for postmenopausal osteoporosis. *Expert Opin Biol Ther*, 10(3), 467-476. doi:10.1517/14712591003604708
- Liedert, A., Kaspar, D., Blakytyn, R., Claes, L., & Ignatius, A. (2006). Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 349(1), 1-5. doi:10.1016/j.bbrc.2006.07.214
- Liedert, A., Wagner, L., Seefried, L., Ebert, R., Jakob, F., & Ignatius, A. (2010). Estrogen receptor and Wnt signaling interact to regulate early gene expression in response to mechanical strain in osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 394(3), 755-759. doi:10.1016/j.bbrc.2010.03.065
- Lin, C. Y., Strom, A., Li Kong, S., Kietz, S., Thomsen, J. S., Tee, J. B., . . . Liu, E. T. (2007). Inhibitory effects of estrogen receptor beta on specific hormone-responsive gene expression and association with disease outcome in primary breast cancer. *Breast Cancer Res*, 9(2), R25. doi:10.1186/bcr1667
- Lindberg, M. K., Movérare, S., Skrtic, S., Gao, H., Dahlman-Wright, K., Gustafsson, J. A., & Ohlsson, C. (2003). Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-

- regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice. *Mol Endocrinol*, 17(2), 203-208. doi:10.1210/me.2002-0206
- Lufkin, E. G., Wahner, H. W., O'Fallon, W. M., Hodgson, S. F., Kotowicz, M. A., Lane, A. W., . . . Riggs, B. L. (1992). Treatment of postmenopausal osteoporosis with transdermal estrogen. *Ann Intern Med*, 117(1), 1-9.
- Mancini, L., Moradi-Bidhendi, N., Brandi, M. L., & MacIntyre, I. (1998). Nitric oxide superoxide and peroxynitrite modulate osteoclast activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 243(3), 785-790. doi:10.1006/bbrc.1998.8175
- Martin, R. B. (2000). Toward a unifying theory of bone remodeling. *Bone*, 26(1), 1-6.
- Matthews, J., & Gustafsson, J. A. (2003). Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv*, 3(5), 281-292. doi:10.1124/mi.3.5.281
- McInerney, E. M., Weis, K. E., Sun, J., Mosselman, S., & Katzenellenbogen, B. S. (1998). Transcription activation by the human estrogen receptor subtype beta (ER beta) studied with ER beta and ER alpha receptor chimeras. *Endocrinology*, 139(11), 4513-4522. doi:10.1210/endo.139.11.6298
- McKenna, N. J., Lanz, R. B., & O'Malley, B. W. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev*, 20(3), 321-344. doi:10.1210/edrv.20.3.0366
- Meczekalski, B., Podfigurna-Stopa, A., & Genazzani, A. R. (2010). Hypoestrogenism in young women and its influence on bone mass density. *Gynecol Endocrinol*, 26(9), 652-657. doi:10.3109/09513590.2010.486452
- Migliaccio, A., Castoria, G., Di Domenico, M., de Falco, A., Bilancio, A., Lombardi, M., . . . Auricchio, F. (2000). Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. *Embo j*, 19(20), 5406-5417. doi:10.1093/emboj/19.20.5406
- Mochizuki, S., Yoshida, S., Yamanaka, Y., Matsuo, H., & Maruo, T. (2005). Effects of estriol on proliferative activity and expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor mRNA in cultured human osteoblast-like osteosarcoma cells. *Gynecol Endocrinol*, 20(1), 6-12.
- Mödder, U. I. (2010). Signalwege der Östrogenrezeptoren in Knochenzellen. *Osteologie*, 111-116.
- Moester, M. J., Papapoulos, S. E., Lowik, C. W., & van Bezooijen, R. L. (2010). Sclerostin: current knowledge and future perspectives. *Calcif Tissue Int*, 87(2), 99-107. doi:10.1007/s00223-010-9372-1
- Monroe, D. G., Getz, B. J., Johnsen, S. A., Riggs, B. L., Khosla, S., & Spelsberg, T. C. (2003). Estrogen receptor isoform-specific regulation of endogenous gene expression in human osteoblastic cell lines expressing either ERalpha or ERbeta. *J Cell Biochem*, 90(2), 315-326. doi:10.1002/jcb.10633
- Monroe, D. G., Secreto, F. J., Subramaniam, M., Getz, B. J., Khosla, S., & Spelsberg, T. C. (2005). Estrogen receptor alpha and beta heterodimers exert unique effects on estrogen- and tamoxifen-dependent gene expression in human U2OS osteosarcoma cells. *Mol Endocrinol*, 19(6), 1555-1568. doi:10.1210/me.2004-0381
- Montano, M. M., Jaiswal, A. K., & Katzenellenbogen, B. S. (1998). Transcriptional regulation of the human quinone reductase gene by antiestrogen-liganded estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta. *J Biol Chem*, 273(39), 25443-25449.
- Moore, J. T., McKee, D. D., Slentz-Kesler, K., Moore, L. B., Jones, S. A., Horne, E. L., . . . Willson, T. M. (1998). Cloning and characterization of human estrogen

- receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun*, 247(1), 75-78. doi:10.1006/bbrc.1998.8738
- Nicks, K. M., Perrien, D. S., Akel, N. S., Suva, L. J., & Gaddy, D. (2009). Regulation of osteoblastogenesis and osteoclastogenesis by the other reproductive hormones, Activin and Inhibin. *Mol Cell Endocrinol*, 310(1-2), 11-20. doi:10.1016/j.mce.2009.07.001
- Niethard, F. U., Pfeil, J., & Biberthaler, P. (2009). *Orthopädie und Unfallchirurgie 78 Tabellen* (6., vollst. überarb. und erw. Aufl. ed.). Stuttgart: Thieme.
- Nomura, S., & Takano-Yamamoto, T. (2000). Molecular events caused by mechanical stress in bone. *Matrix Biol*, 19(2), 91-96.
- Norman, B. H., Dodge, J. A., Richardson, T. I., Borromeo, P. S., Lugar, C. W., Jones, S. A., . . . Krishnan, V. (2006). Benzopyrans are selective estrogen receptor beta agonists with novel activity in models of benign prostatic hyperplasia. *J Med Chem*, 49(21), 6155-6157. doi:10.1021/jm060491j
- O'Brien, C. A. (2010). Control of RANKL gene expression. *Bone*, 46(4), 911-919. doi:10.1016/j.bone.2009.08.050
- Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y., & Muramatsu, M. (1998). Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betacx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res*, 26(15), 3505-3512.
- Ozcvici, E., Luu, Y. K., Adler, B., Qin, Y. X., Rubin, J., Judex, S., & Rubin, C. T. (2010). Mechanical signals as anabolic agents in bone. *Nat Rev Rheumatol*, 6(1), 50-59. doi:10.1038/nrrheum.2009.239
- Pacifici, R. (2008). Estrogen deficiency, T cells and bone loss. *Cell Immunol*, 252(1-2), 68-80. doi:10.1016/j.cellimm.2007.06.008
- Paech, K., Webb, P., Kuiper, G. G., Nilsson, S., Gustafsson, J., Kushner, P. J., & Scanlan, T. S. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science*, 277(5331), 1508-1510.
- Parikka, V., Lehenkari, P., Sassi, M. L., Halleen, J., Risteli, J., Harkonen, P., & Vaananen, H. K. (2001). Estrogen reduces the depth of resorption pits by disturbing the organic bone matrix degradation activity of mature osteoclasts. *Endocrinology*, 142(12), 5371-5378. doi:10.1210/endo.142.12.8533
- Pavalko, F. M., Norvell, S. M., Burr, D. B., Turner, C. H., Duncan, R. L., & Bidwell, J. P. (2003). A model for mechanotransduction in bone cells: the load-bearing mechanosomes. *J Cell Biochem*, 88(1), 104-112. doi:10.1002/jcb.10284
- Pedram, A., Razandi, M., & Levin, E. R. (2006). Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol Endocrinol*, 20(9), 1996-2009. doi:10.1210/me.2005-0525
- Pfleiderer A., B. M., Martius G. *Gynäkologie und Geburtshilfe* (Vol. 4).
- Potier, E., Noailly, J., & Ito, K. (2010). Directing bone marrow-derived stromal cell function with mechanics. *J Biomech*, 43(5), 807-817. doi:10.1016/j.jbiomech.2009.11.019
- Preisinger, E. (2007). RANK/RANK-Ligand/OPG: Ein neuer Therapieansatz in der Osteoporosebehandlung. *Journal für Mineralstoffwechsel*, 14 (4). doi:<https://www.kup.at/kup/pdf/6737.pdf>
- Qin, C., Samudio, I., Ngwenya, S., & Safe, S. (2004). Estrogen-dependent regulation of ornithine decarboxylase in breast cancer cells through activation of nongenomic cAMP-dependent pathways. *Mol Carcinog*, 40(3), 160-170. doi:10.1002/mc.20030

- Ralston, S. H. (2010). Genetics of osteoporosis. *Ann N Y Acad Sci*, 1192, 181-189. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05317.x
- Ray, A., Prefontaine, K. E., & Ray, P. (1994). Down-modulation of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol in the absence of high affinity DNA binding by the estrogen receptor. *J Biol Chem*, 269(17), 12940-12946.
- Rody, A., Holtrich, U., Solbach, C., Kourtis, K., von Minckwitz, G., Engels, K., . . . Kaufmann, M. (2005). Methylation of estrogen receptor beta promoter correlates with loss of ER-beta expression in mammary carcinoma and is an early indication marker in premalignant lesions. *Endocr Relat Cancer*, 12(4), 903-916. doi:10.1677/erc.1.01088
- Russell, R. G., Watts, N. B., Ebetino, F. H., & Rogers, M. J. (2008). Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int*, 19(6), 733-759. doi:10.1007/s00198-007-0540-8
- Rüther, W., Lohmann, C. H., & Pitzen, P. (2014). *Orthopädie und Unfallchirurgie* (20., überarb. und aktualisierte Aufl. ed.). München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Samudio, I., Vyhldal, C., Wang, F., Stoner, M., Chen, I., Kladdé, M., . . . Safe, S. (2001). Transcriptional activation of deoxyribonucleic acid polymerase alpha gene expression in MCF-7 cells by 17 beta-estradiol. *Endocrinology*, 142(3), 1000-1008. doi:10.1210/endo.142.3.8022
- Satir, P., Pedersen, L. B., & Christensen, S. T. (2010). The primary cilium at a glance. *J Cell Sci*, 123(Pt 4), 499-503. doi:10.1242/jcs.050377
- Saville, B., Wormke, M., Wang, F., Nguyen, T., Enmark, E., Kuiper, G., . . . Safe, S. (2000). Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *J Biol Chem*, 275(8), 5379-5387.
- Saxon, L. K., Robling, A. G., Castillo, A. B., Mohan, S., & Turner, C. H. (2007). The skeletal responsiveness to mechanical loading is enhanced in mice with a null mutation in estrogen receptor-beta. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293(2), E484-491. doi:10.1152/ajpendo.00189.2007
- Saxon, L. K., & Turner, C. H. (2005). Estrogen receptor beta: the antimechanostat? *Bone*, 36(2), 185-192. doi:10.1016/j.bone.2004.08.003
- Schlegel, A., Wang, C., Katzenellenbogen, B. S., Pestell, R. G., & Lisanti, M. P. (1999). Caveolin-1 potentiates estrogen receptor alpha (ERalpha) signaling. caveolin-1 drives ligand-independent nuclear translocation and activation of ERalpha. *J Biol Chem*, 274(47), 33551-33556.
- Schlegel, A., Wang, C., Pestell, R. G., & Lisanti, M. P. (2001). Ligand-independent activation of oestrogen receptor alpha by caveolin-1. *Biochem J*, 359(Pt 1), 203-210.
- Seefried, L., Ebert, R., Müller-Deubert, S., Klotz, B., Kober, M., Liedert, A., . . . Jakob, F. (2010). Mechanotransduction in aging and osteoporosis. *Osteologie*, 19, 232-239.
- Seefried, L., Ebert, R., Müller-Deubert, S., Klotz, B., Kober, M., Liedert, A., . . . Jakob, F. (2010). Mechanotransduktion im Alter und bei Osteoporose. *Osteologie*.
- Seefried, L., Mueller-Deubert, S., Schwarz, T., Lind, T., Mentrup, B., Kober, M., . . . Ebert, R. (2010). A small scale cell culture system to analyze mechanobiology using reporter gene constructs and polyurethane dishes. *Eur Cell Mater*, 20, 344-355.
- Shinoda, Y., Kawaguchi, H., Higashikawa, A., Hirata, M., Miura, T., Saito, T., . . . Ogata, N. (2010). Mechanisms underlying catabolic and anabolic functions of parathyroid hormone on bone by combination of culture systems of mouse cells. *J Cell Biochem*, 109(4), 755-763. doi:10.1002/jcb.22454

- Shuster, L. T., Rhodes, D. J., Gostout, B. S., Grossardt, B. R., & Rocca, W. A. (2010). Premature menopause or early menopause: long-term health consequences. *Maturitas*, *65*(2), 161-166. doi:10.1016/j.maturitas.2009.08.003
- Sims, N. A., Dupont, S., Krust, A., Clement-Lacroix, P., Minet, D., Resche-Rigon, M., . . . Baron, R. (2002). Deletion of estrogen receptors reveals a regulatory role for estrogen receptors-beta in bone remodeling in females but not in males. *Bone*, *30*(1), 18-25.
- Sjogren, K., Lagerquist, M., Moverare-Skrtic, S., Andersson, N., Windahl, S. H., Swanson, C., . . . Ohlsson, C. (2009). Elevated aromatase expression in osteoblasts leads to increased bone mass without systemic adverse effects. *J Bone Miner Res*, *24*(7), 1263-1270. doi:10.1359/jbmr.090208
- Skliris, G. P., Munot, K., Bell, S. M., Carder, P. J., Lane, S., Horgan, K., . . . Speirs, V. (2003). Reduced expression of oestrogen receptor beta in invasive breast cancer and its re-expression using DNA methyl transferase inhibitors in a cell line model. *J Pathol*, *201*(2), 213-220. doi:10.1002/path.1436
- Srivastava, S., Toraldo, G., Weitzmann, M. N., Cenci, S., Ross, F. P., & Pacifici, R. (2001). Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation. *J Biol Chem*, *276*(12), 8836-8840. doi:10.1074/jbc.M010764200
- Sun, G., Porter, W., & Safe, S. (1998). Estrogen-induced retinoic acid receptor alpha 1 gene expression: role of estrogen receptor-Sp1 complex. *Mol Endocrinol*, *12*(6), 882-890. doi:10.1210/mend.12.6.0125
- Tomkinson, A., Reeve, J., Shaw, R. W., & Noble, B. S. (1997). The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *J Clin Endocrinol Metab*, *82*(9), 3128-3135. doi:10.1210/jcem.82.9.4200
- Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E., & Chambon, P. (1989). The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell*, *59*(3), 477-487.
- Venken, K., Callewaert, F., Boonen, S., & Vanderschueren, D. (2008). Sex hormones, their receptors and bone health. *Osteoporos Int*, *19*(11), 1517-1525. doi:10.1007/s00198-008-0609-z
- Wang, L., Wang, Y. D., Wang, W. J., & Li, D. J. (2009). Differential regulation of dehydroepiandrosterone and estrogen on bone and uterus in ovariectomized mice. *Osteoporos Int*, *20*(1), 79-92. doi:10.1007/s00198-008-0631-1
- Wehrle, E., Liedert, A., Heilmann, A., Wehner, T., Bindl, R., Fischer, L., . . . Ignatius, A. (2015). The impact of low-magnitude high-frequency vibration on fracture healing is profoundly influenced by the oestrogen status in mice. *Disease models & mechanisms*, *8*(1), 93-104. doi:10.1242/dmm.018622
- Wehrle, E., Wehner, T., Heilmann, A., Bindl, R., Claes, L., Jakob, F., . . . Ignatius, A. (2014). Distinct frequency dependent effects of whole-body vibration on non-fractured bone and fracture healing in mice. *J Orthop Res*, *32*(8), 1006-1013. doi:10.1002/jor.22629
- Weinstein, R. S., Jilka, R. L., Parfitt, A. M., & Manolagas, S. C. (1998). Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest*, *102*(2), 274-282. doi:10.1172/jci2799
- Xu, J., & O'Malley, B. W. (2002). Molecular mechanisms and cellular biology of the steroid receptor coactivator (SRC) family in steroid receptor function. *Rev Endocr Metab Disord*, *3*(3), 185-192.

Literaturverzeichnis

- Xu, X. H., Dong, S. S., Guo, Y., Yang, T. L., Lei, S. F., Papasian, C. J., . . . Deng, H. W. (2010). Molecular genetic studies of gene identification for osteoporosis: the 2009 update. *Endocr Rev*, 31(4), 447-505. doi:10.1210/er.2009-0032
- Zhao, C., Dahlman-Wright, K., & Gustafsson, J. A. (2008). Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl Recept Signal*, 6, e003. doi:10.1621/nrs.06003
- Zhao, C., Lam, E. W., Sunters, A., Enmark, E., De Bella, M. T., Coombes, R. C., . . . Dahlman-Wright, K. (2003). Expression of estrogen receptor beta isoforms in normal breast epithelial cells and breast cancer: regulation by methylation. *Oncogene*, 22(48), 7600-7606. doi:10.1038/sj.onc.1207100
- Zhao, C., Matthews, J., Tujague, M., Wan, J., Strom, A., Toresson, G., . . . Dahlman-Wright, K. (2007). Estrogen receptor beta2 negatively regulates the transactivation of estrogen receptor alpha in human breast cancer cells. *Cancer Res*, 67(8), 3955-3962. doi:10.1158/0008-5472.can-06-3505
- Zhao, Q., Shao, J., Chen, W., & Li, Y. P. (2007). Osteoclast differentiation and gene regulation. *Front Biosci*, 12, 2519-2529.

Danksagung

Folgend möchte ich mich gerne bei all jenen bedanken, die mich bei der Durchführung der Dissertation unterstützt und mich auf dem Weg dorthin begleitet haben.

Herrn Prof. Dr. Franz Jakob danke ich sehr herzlich für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und die Möglichkeit, dieses Projekt durchzuführen. Vielen Dank für die vielen Anregungen, Ihre Zeit und die äußerst angenehme Kommunikation. Herrn Prof. Dr. Martin Fassnacht gilt mein Dank für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto für die Übernahme der Berichterstattung. Für die intensive Zusammenarbeit möchte ich mich bei Dr. med. Lothar Seefried, Melanie Kober sowie insbesondere Prof. Dr. Regina Ebert bedanken. Regina Ebert lässt als Betreuerin sowohl menschlich als auch fachlich keine Wünsche offen. Sie ist eine Quelle an Inspiration und Ideen und lässt neben der fachlichen Kompetenz immer noch Raum für Humor und persönliches Interesse. Ihre wertvollen Anregungen und Ratschläge habe ich sehr geschätzt. Vielen Dank für die hervorragende Betreuung und engagierte Unterstützung!

Ein großes Dankeschön gilt natürlich auch dem gesamten Laborteam. Dr. rer. nat. Peggy Benisch, Dr. rer. nat. Sigrid Deubert-Müller, Dr. rer. nat. Barbara Klotz, Jutta Meißner-Weigl, Dr. rer. nat. Birgit Mentrup, Martina Regensburger, Doris Schneider und Sabine Zeck haben mich freundlich und offen aufgenommen und mir sofort das Gefühl vermittelt, Mitglied des Teams zu sein. Neben ihrer Kompetenz sorgten sie mittels humorvoller und positiver Stimmung dafür, dass es Freude machte, ins Labor zu kommen; sie zeigten ein offenes Ohr und ehrliches Interesse bei aufkommenden Problemen und beantworteten mit viel Geduld meine Fragen. Dr. rer. nat. Sigrid Deubert-Müller danke ich für die Unterstützung und Diskussion in Bezug auf die Versuche mit Reporter-Konstrukten.

Mein innigster Dank gilt meinen Eltern. Zunächst bin ich ihnen sehr dankbar, dass sie mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht haben. Ich danke jedoch auch für die jahrelange, unendliche Unterstützung, ihr kontinuierliches Interesse an diesem Projekt und ihr Vertrauen. Sie haben mir die Möglichkeit gegeben, meine Interessen zu verfolgen, ohne mich jemals unter Druck zu setzen, was ich sehr zu schätzen weiß.