



universität
wien

DIPLOMARBEIT

UNTERSUCHUNG VON ROBURIN B UND VESCALAGIN MITTELS OSTEOBLASTEN-OSTEOKLASTEN RESORPTIONSMODELL UND PROLIFERATIONSASSAY

zur Erlangung des akademischen Grades
Magister Pharmaciae (Mag.pharm.)
an der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Universität Wien

Verfasser/in: Daniel Danninger
Matrikelnummer: 9826590
Studienrichtung: Pharmazie (A449)
Begutachter: Prof. Dr. Oskar Hoffmann

Wien, am 25.05.2009

*Sobald jemand in einer Sache
Meister geworden ist,
sollte er in einer neuen Sache Schüler werden.
(Gerhard Hauptmann)*

INHALTSVERZEICHNIS:

1	Einleitung	6
1.1	Skelettbau, allgemein	7
1.2	Knochen	7
1.2.1	Blutversorgung des Knochens	9
1.2.2	Chondrozyten	9
1.2.3	Mesenchymzellen	9
1.2.4	Osteoblasten	9
1.2.5	Ca ⁺⁺ - und Phosphat Homöostase	10
1.2.6	Parathormon und Vitamin D ₃ (Calcitriol)	10
1.2.7	Osteopontin	12
1.2.8	Osteonektin	12
1.2.9	Osteocalcin	12
1.2.10	Osteozyten	13
1.2.11	Osteoklasten	13
1.2.12	Knochenmatrix	16
1.2.13	Periost	16
1.2.14	Endost	17
1.2.15	Geflechtknochen	17
1.2.16	Lamellenknochen	17
1.2.17	Knochenentwicklung allgemein	18
1.2.18	Desmale Osteogenese	19
1.2.19	Chondrale, kartilaginäre Osteogenese	19
1.2.20	RANKL/RANK – OPG-System	19
1.2.21	Bone remodeling	20
1.2.22	Rachitis und Osteomalazie	21
1.2.23	Osteoporose und deren Therapie	23
1.3	Knochenresorption	30
1.4	Die MAP-Kinasen, allgemein	30
1.5	Die „extracellular signal regulated kinase“ – ERK Kaskade	34
1.6	Die Ras Proteine	36
1.7	Die Raf Kinase	37
1.8	Die MEK Kinasen	38
1.9	Die p38 MAPKinase Kaskade	38
1.10	Das G-Protein gekoppelte Rezeptorsignalsystem	38
1.11	Der JNK Signalweg:	39
1.12	Der PKB Signalweg	40
2	Zielsetzung	42

2.1	Testsubstanzen	42
2.1.1	Tannine allgemein	42
2.1.2	Ellagitannine	43
2.1.3	SASN6 (=Roburin B)	46
2.1.4	SASN1 (=Vescalagin)	46
3	Material und Methoden	47
3.1	Material	47
3.1.1	Laborgeräte	47
3.1.2	Chemikalien, Lösungen und Medien	48
3.1.3	Antikörper	56
3.1.4	Mäuse	60
3.1.5	Zellen	61
3.2	Methoden	62
3.2.1	Osteoblasten-Osteoklasten Cokultur, Pitassay	62
3.2.2	Vorbereitung der Knochenplättchen	63
3.2.3	Reinigung und Vorinkubation	63
3.2.4	Osteoblasten Aussaat	63
3.2.5	Knochenmarkextraktion	64
3.2.6	Toluidinblaufärbung	64
3.2.7	Cell^F, Statview, Prism	64
3.2.8	Osteoklastenherstellung aus RAW264.7 bzw. NIH3T3 Zelllinie	66
3.2.9	Zelllyse	67
3.2.10	Proteinassay	68
3.2.11	Gelelektrophorese	69
3.2.12	Western Transfer	75
3.2.13	Immunodetektion	78
3.2.14	Stripping & Reprobing	79
4	Resultate	80
4.1	Austestung von 2 verschiedenen Seren	80
4.2	Ergebnis der Resorptionsaktivität von Osteoklasten durch Roburin B	81
4.3	Targeting verschiedener intrazellulärer Kinasen auf einer RAW 264.7 Zellkultur unter Einfluss von Roburin B	87
4.4	Austestung von 2 verschiedenen phospho AKT AK mit NIH3T3 Zellen und 2 unterschiedl. Lysisbuffern	93
4.5	Targeting verschiedener Kinasen auf einer RAW 264.7 Zellkultur unter Einfluss von Vescalagin	95
5	Diskussion	101
6	Zusammenfassung	105

7	Danksagung	106
8	Curriculum vitae	106
9	Abbildungsverzeichnis	108
10	Tabellenverzeichnis	109
11	Literaturverzeichnis	109

1 EINLEITUNG

Tabelle 1: Liste der verwendeten Abkürzungen

Abkürzungen	voller Name
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
A431	Protein
APS	<u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfat
Blot	Nitrozellulosemembran
Ca ⁺⁺	<u>C</u> alcium
ECL	<u>E</u> nhanced <u>C</u> hemiluminescence
EDTA	<u>E</u> thylend <u>a</u> mi <u>n</u> tetraessigsäure
ELISA	<u>E</u> nzyme-l <u>i</u> nk <u>e</u> d <u>i</u> mmunosorbent <u>A</u> ssay
EtOH	<u>E</u> thanol
FCS f. BM	<u>F</u> etal <u>C</u> alf <u>S</u> erum for <u>B</u> one <u>M</u> arrow
FCS _{hi} .	<u>F</u> etal <u>C</u> alf <u>S</u> erum <u>h</u> itze <u>i</u> naktiviert
H	Stunde
IgG	<u>I</u> mmun <u>g</u> lobulin <u>G</u>
IL	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin
Isoprop.	Isopropylalkohol
kDa	<u>K</u> ilo <u>d</u> alton
LB	<u>L</u> ysis <u>b</u> uffer
M	<u>M</u> olar
M	<u>M</u> illi (10 ⁻³)
mA	<u>M</u> illiampere
MAP Kinase	<u>M</u> itogen <u>a</u> ctivated <u>p</u> rotein <u>k</u> inase
M-CSF	<u>M</u> acrophage - <u>c</u> olony <u>s</u> timulating <u>f</u> actor
MEM	<u>M</u> inimal <u>e</u> ssentielles <u>M</u> edium
MeOH	<u>M</u> ethanol
NaN ₃	<u>N</u> atrium <u>a</u> zid
NIH 3T3	Mouse embryonic fibroblast cell line
OB	<u>O</u> steo <u>b</u> lasten
OC	<u>O</u> steo <u>k</u> lasten
OPG	<u>O</u> steo <u>p</u> rote <u>g</u> erin
OPGL	<u>O</u> steo <u>p</u> rote <u>g</u> erin <u>L</u> igand
OS	<u>O</u> ber <u>s</u> eite
P/S	<u>P</u> enicillin/ <u>S</u> treptomycin
PBS	<u>P</u> hosphat <u>g</u> e <u>p</u> ufferte <u>S</u> alzlösung
PBS-ECL	<u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>S</u> aline Solution
PDGF	<u>P</u> latelet - <u>D</u> erived <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
PGE ₂	<u>P</u> rostag <u>l</u> andin <u>E</u> ₂
PMSF	<u>P</u> henyl <u>m</u> ethyl <u>s</u> ulfonyl <u>f</u> luorid, Benzylsulfonylfluorid
PTH	<u>P</u> arath <u>o</u> rmon

RANKL	R eceptor a ctivator of NF _κ B L igand
RAW 264.7	"Mouse leukemic monocyte macrophage cell line"
SASN1	Vescalagin
SASN6	Roburin B
SB	S ample B uffer
SDS-PAGE	S odium d odecyl s ulfate p oly a crylamide g ele e lectrophoresis
TBS	T RI S B uffered Saline S olution
TBST 0,1%	T RI S B uffered Saline S olution T ween 20
TEMED	N,N,N,N- T etra m ethyle t hylen d iamin
TNF	T umor - N ekrose F aktor
TRAP	Tatratresistente saure Phosphatase
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan, Trometamol, Trizma®
Tween 20	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat
US	U nter s eite
V	V olt
WE	W ochen e nde

1.1 Skelettbau, allgemein

Das Skelett (gr. skeletos = ausgetrockneter Körper) besteht aus ungefähr 200 Einzelknochen und bildet das Stützgerüst des Menschen.

Im Gegensatz zu den Arthropoden (Gliederfüßern), welche ein Exoskelett ausgebildet haben, besitzt der Humanide ein Endoskelett innerhalb des Körpers.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil sind Knorpel in den Gelenkbereichen.

Histologisch gesehen sind die Knochen, abgesehen von Sehnenansätzen und dem Felsenbein, Lamellenknochen. Zusätzlich zu der Stützfunktion dient das Skelett noch als Schutz bzw. Calcium/Phosphatspeicher und Produktionsort von Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten.

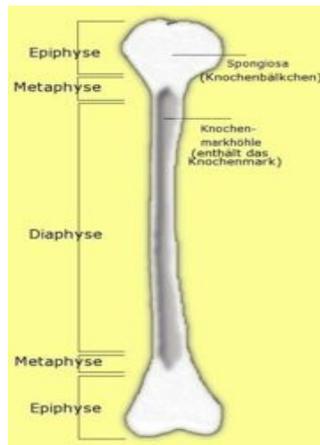
1.2 Knochen

Der Knochen (lat. Os, siehe Abbildung 1) wird osteologisch wie folgt unterteilt:

1) Ossa longa (Röhrenknochen) zb. Humerus, Tibia, Femur

Diese bestehen aus einer einheitlichen Markhöhle mit Knochenmark.

Abbildung 1: Röhrenknochen



Die beiden Epiphysen bestehen aus einer Art Knochenschwamm (Substantia spongiosa) welche nach den Trajektorien ausgerichtet ist. Zwischen den Knochenbälkchen (Cellulae medullares) befindet sich das Knochenmark. Die Substantia compacta überzieht die S. spongiosa. Des Weiteren sitzt an den Gelenksflächen ein hyaliner Knorpel. In der Diaphyse findet man kein Trabekelwerk, sondern nur eine Markhöhle mit Knochenmark. (Cavum medullare)

Die Epiphysenfuge, welche sich zwischen Epiphyse und Diaphyse befindet, besteht in der Wachstumsphase aus Knorpel und gewährleistet das Längenwachstum des Knochens. Ab dem 20. Lebensjahr verknöchert diese Wachstumsfuge und es entsteht eine sichtbare Epiphysenlinie (Linea epiphysealis).

2) *Ossa brevia* (kurze Knochen): Hand- und Fußwurzelknochen

3) *Ossa plana* (flache Knochen): Rippen, Sternum, Scapula und Os ilium

4) *Ossa sesamoidea* (Sesambeine): in Sehnen eingelagerte Knochen zb.: Kniescheibe

Zusätzlich genannt werden sollen die unregelmäßigen Knochen (zb.: Wirbeln) und *Ossa pneumatica* (lufthaltige Knochen) zu denen Stirnbein, Kiefer und Nasennebenhöhlen zählen. (Kopsch, 2003)

1.2.1 Blutversorgung des Knochens

Knochengewebe wird sehr gut durchblutet. Es kann zum Beispiel bei einer Oberschenkelfraktur leicht zu einem Blutverlust von 1,5-2 Liter kommen. Ausgehend von der Markhöhle wird der Knochen arteriell mit Blut versorgt, wobei der venöse Abfluss zentripetal verläuft. Aus dem Markraum dringt ein Netz von Arteriolen in die Kortikalis und verzweigt sich hier in Form von Havers'schen und Volkmann'schen Gefäßen. Äußerlich steht der Kortikalis mit dem Gefäßnetz, der Kambiumschicht des Periostes in Verbindung. (Kopsch, 2003)

1.2.2 Chondrozyten

Hierbei handelt es sich um abgeflachte Knorpelzellen, welche aus Chondroblasten entstehen. Aufgrund ihres großen Golgi-Apparates und großen Mengen an Endoplasmatischem Retikulum zeigen sie eine hohe Syntheseaktivität. Ihre Aufgabe ist die Bildung von Typ II Kollagen und der Grundsubstanz des Knorpelgewebes (Chondroid).

1.2.3 Mesenchymzellen

Diese gehen meist aus dem Mesoderm hervor. Es handelt sich um pluripotente, embryonale, sternförmig verzweigte Bindegewebszellen mit hoher Mitoserate. Aus diesen Zellen entstehen Knochen, Sehnen, Muskel, und Blutzellen.

1.2.4 Osteoblasten

Osteoblasten sind oval bis rund, sehr groß und ihr Ursprung liegt in den mesenchymalen Stammzellen (Osteoprogenitorzellen), welche im Knochenmark und Periosteum zu finden sind. Sie exprimieren den Transkriptionsfaktor Cbfa1/Runx2. Osteoprogenitorzellen differenzieren unter dem Einfluss von BMP (**B**one **M**orphogenetic **G**enes), GF (**G**rowth **F**actors), FGF (**F**ibroblast **G**rowth **F**actor), PDGF (**P**latelet **D**erived **G**rowth **F**actor) und TGF- β (**T**ransforming **G**rowth **F**actor **B**eta). Sobald Osteoprogenitorzellen in Osteoblasten differenzieren, exprimieren sie eine Reihe von Signalen: Osterix, Col1, ALP, Osteocalcin, Osteopontin, Osteonectin.

Wege zur Sichtbarmachung von OB sind einerseits die Färbung von Typ I Kollagen oder der alkalischen Phosphatase. Osteoblasten produzieren Osteoid, was den Hauptbestandteil von Typ I Kollagen darstellt. Außerdem sind OB verantwortlich für die Mineralisation der Osteoid Matrix. Weiters sind sie reich an Glykogen, alkalischer Phosphatase, β -Glucuronidase, Ribosomen und Mitochondrien. Nach Abschluss des Knochenbaus werden sie zu Osteozyten.

1.2.5 Ca^{++} - und Phosphat Homöostase

Als Hauptspeicher des Calcium und Phosphatspeicher im Körper dient der Knochen. Diese werden über den Darm aufgenommen bzw. über die Niere ausgeschieden. Die Steuerung dieses komplexen endokrinen Systems übernimmt das Peptidhormon **Parathormon** (PTH) sowie das Steroidhormon 1,25-Dihydroxycholecalciferol. 1,25 (OH)₂ Vitamin D₃=Calcitriol

Die Sekretion regelt ein Feedbackmechanismus über den Calcium Serumspiegel. (Renz-Polster, et al., 2008)

1.2.6 Parathormon und Vitamin D₃(Calcitriol)

Diese Hormone gehören zum calciotropen System.

Ad Parathormon(PTH):

Bei PTH handelt es sich um ein Polypeptidhormon mit der Länge von 84 Aminosäuren, wobei der biologisch aktive Teil von 1-34 liegt. Der Bildungsort sind die Nebenschilddrüsen. Die mittlere Serumkonzentration liegt unter 50 pg/ml.

Ad Vitamin D₃, Calcitriol:

Vitamin D gehört in die Gruppe der bioaktiven Steroidhormone.

Es kann einerseits über die Nahrung als Vorläuferhormon (Prohormon) aus pflanzlicher (Ergocalciferol) oder andererseits aus tierischer (Cholecalciferol) Herkunft aufgenommen werden. Die endogene Synthese von Cholecalciferol erfolgt in der Haut aus dem Vorläufer 7,8-Dehydrocholesterin. Für diese Umwandlung wird UV Strahlung in Form von Sonnenlicht benötigt.

In der Leber werden diese Verbindungen zu 25-Hydroxycholecalciferol = Calcidiol hydroxyliert. Calcidiol ist die Speicherform von Vitamin D im Körper. Bei Bedarf wird aus Calcidiol in der Niere das biologisch aktive 1,25-Dihydrocholecalciferol = Calcitriol.

Chronische Niereninsuffizienz stellt nun eine klinisch sehr bedeutende Störung des Vitamin D Stoffwechsels dar. Unbehandelt kann es zu einer renalen Osteopathie führen. (Renz-Polster, et al., 2008)

Übersicht der Hauptwirkungen von PTH, Calcitonin und Calcitriol:

Tabelle 2: Wirkungen von PTH und Calcitriol

Hormon	Hauptfunktion	Skelett	Nieren	Darm
PTH	Verhindert zu niedrigen Calciumspiegel	Erhöht die Mobilisierung von Ca ⁺⁺ und Phosphat	Erhöht die Ca ⁺⁺ Reabsorption; Erhöht die Phosphat ausscheidung; Erhöht 1,25(OH) ₂ D ₃ Synthese	Keine direkte Wirkung
Calcitriol	Fördert Knochenmineralisierung	Mineralisierung	Erhöht die Ca ⁺⁺ Reabsorption	Erhöht die Resorption von Ca ⁺⁺ & Phosphat

1.2.7 Osteopontin

Dieses Glykoprotein (Synonyme sind Sialoprotein I bzw. 44K Bonephosphoprotein oder SPP1) wurde 1986 in Osteoblasten entdeckt. Osteopontinsynthese findet man nicht nur in den OB, sondern auch in Präosteoblasten, Osteozyten, Niere, Plazenta Knochenmark und Endothelzellen. Stimuliert wird die Produktion von Calcitriol. Osteopontin ist ein Ligand der Adhäsionsmoleküle Integrin und CD₄₄, wodurch es die Zellmigration vermittelt. Es zeigt eine breite Expression in Karzinomzellen und stimuliert die Interleukin 12 Antwort in der infektiösen Immunantwort.

1.2.8 Osteonektin

Osteoblasten exprimieren dieses Glykoprotein während der Differenzierungsphase. Es hat die Fähigkeit Calcium zu binden und den Mineralisationsvorgang zu initiieren.

1.2.9 Osteocalcin

Dieses wird ebenfalls von Osteoblasten produziert. Es handelt sich um ein nichtkollagenes Protein, welches eine wichtige Rolle in der Mineralisation und Calciumhomöostase spielt.

2007 wurde entdeckt, dass es auch eine Hormonaufgabe erfüllt. So erhöht es als erstes die Insulinfreisetzung im Pankreas andererseits führt es dazu, dass Fettzellen das Hormon Adiponectin freisetzen. Dadurch erhöht sich die Insulinsensitivität. (Karsenty, 2007)

1.2.10 Osteozyten

Bezeichnet die „Ruheform“ der Osteoblasten. Hierbei handelt es sich um flache, mandelförmige, nicht mehr teilungsfähige Zellen, die vollständig von Osteoid, später mineralisierter Matrix umgeben sind. Sie besitzen einen dichten chromatinreichen Kern, wenig gER, einen kleinen Golgi-Apparat und daraus resultierend eine geringe Syntheseaktivität. Osteozyten stehen über Zytoplasmafortsätze in den Canaliculi ossei miteinander und mit dem Canalis centralis eines Osteons in Verbindung.

Oben genannte Fortsätze stehen über Gap Junctions in Verbindung und gewährleisten den interzellulären Fluss von Ionen und kleinen Molekülen.

1.2.11 Osteoklasten

Der Osteoklast (lat. gr. Knochen und brechen) ist jene Zelle, die zur Knochenresorption befähigt ist. Seinen Ursprung hat er im Knochenmark, wo Osteoklasten sich aus mononukleären Vorläuferzellen zu mehrkernigen Riesenzellen (50-100 µm Durchmesser) mit bis zu 10 Kernen entwickeln. Charakteristisch für diese Zellen ist eine hohe Expressierung von TRAP (Tartrat resistente saure Phosphatase) und Cathepsin K. (Kurihara, et al., 1990)

Ad Cathepsin K:

Dies sind Proteasen mit einem Cystein im aktiven Zentrum. Cathepsin wird von reifen Osteoklasten gebildet. Intrazellulär liegt es als Präkursor mit einer Länge von 329 AS vor. Für die Knochenresorption wird es autokatalytisch in seine 215 AS lange Aktivform übergeführt und der inaktive Rest abgespalten. Man kann also sagen, dass die Cathepsin-K Menge mit der Osteoklastenaktivität korreliert. (Krampla, 2007),

Osteoklasten befinden sich an der Knochenoberfläche, den sogenannten Resorptionslakunen (Howship-Lakunen). Den apikalen Pol des Osteoklasten, der dem Knochen zugewandt ist, kann man in verschiedene Bereiche unterteilen.

Der zentrale „ruffled border“ stellt den Ort der eigentlichen Knochenresorption dar. Es handelt sich um eine helle, gestreifte und vesikelreiche Zone, in der die Zellmembran in Form eines Bürstensaums stark gefaltet ist. (Tsukii, et al., 1998)

Peripher befindet sich die „sealing zone“. Diese Zone zeigt lichtmikroskopisch eine intensive Färbung und stellt jenen Ort dar, wo sich der Osteoklast mittels Adhäsionsproteine (Integrine) an der Knochensubstanz anhaftet. Der Spalt ist zwischen 0,3-0,5 nm breit. (Tondravi, et al., 1997)

Ad Integrine:

Integrine, auch Transmembranproteine kommen in der Außen- und Innenschicht der Zellmembran vor. Sie haben große Bedeutung als Adhäsionsmoleküle und koppeln Zellen mit Zellen oder Zellen mit dem Extrazellulärraum. Der extrazelluläre Anteil (Proteindomäne) dieser Transportproteine besitzt eine RGD-Sequenz (Arg-Gly-Asp).

Vom chemischen Aufbau her handelt es sich um Heterodimere und Glykoproteine, wobei beim Menschen 24 verschiedene bekannt sind.

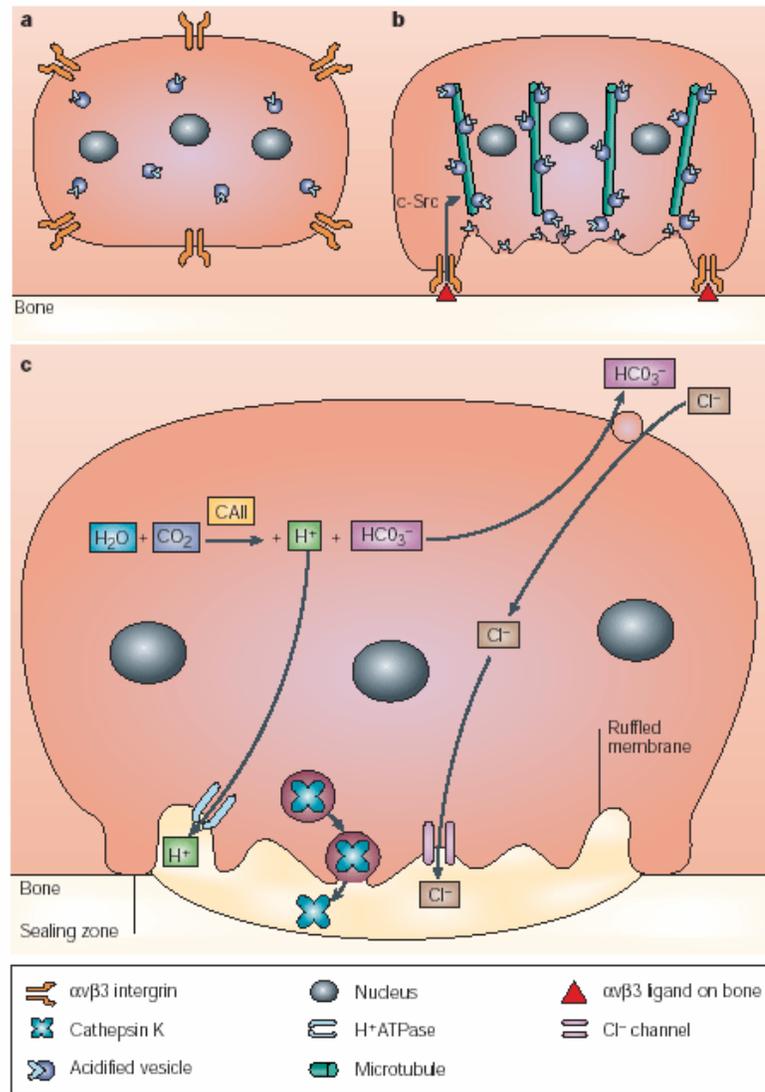
Des Weiteren findet man eine Zone (clear zone), welche die „sealing zone“ umgibt. Sie ist besonders arm an Zellorganellen und reich an kontraktilen Proteinen (Aktin).

Für den Abbau des Knochens wird ein pH-Wert von ~4,5 in der „sealing zone“ erzeugt. Osteoklasten sezernieren darauf proteolytische Enzyme, welche die kollagene Knochenmatrix auflösen. Die freigesetzten Kollagenfragmente werden phagozytiert und es entsteht eine Howship-Lakune, sprich „Fressspur“ der Osteoklasten.

Aufzuzählen sind auch noch diverse Osteoklasten bezogene Krankheiten, wie zum Beispiel die Osteopetrose, welche durch verminderte Osteoklastentätigkeit entsteht.

Erhöhte Osteoklastentätigkeit findet man bei Osteoporose, Hyperparathyreoidismus, Osteodystrophia deformans, rheumatoider Arthritis, Osteogenesis imperfecta und auch Brustkrebs. (Bellido, et al., 1995), (Girasole, 1992), (Shevde, et al., 2000)

Abbildung 2: Regulation der Osteoklastenaktivität



Osteoklasten enthalten saure Vesikeln, welche H⁺ATPase exprimieren. Gleichmaßen wird das Integrin $\alpha\beta3$ (siehe Abbildung 2) auf der Plasmamembran exprimiert. Angelagert am Knochen wandert das Integrin zur matrixzugewandten Membran und überträgt ein c-Src abhängiges Signal, welches die Verbindung zwischen den sauren Vesikeln und den Mikrotubuli herstellt. Die Vesikeln bewegen sich entlang der Mikrotubuli Richtung Membran und formen komplexe Einstülpungen, die so genannte „ruffled border membrane“. Die Knochenresorption startet mit der Bildung einer aktinreichen „sealing zone“, welche die resorbierende

Mikroumgebung vom restlichen Extrazellularraum abschirmt. Das Enzym Carboanhydrase II liefert die Protonen für die Mikroumgebung und senkt den pH Wert auf ~4,5, welcher zum Abbau der mineralischen Knochensubstanz führt. Die intrazelluläre pH Homöostase wird durch den Austausch von Bikarbonat gegen Cl⁻ Ionen aufrechterhalten. Das in Vesikeln angesiedelte Cathepsin K wird in einem exozytischen Prozess ausgestoßen und ist für den Abbau der organischen Knochenmatrix verantwortlich. (Teitelbaum, 2003)

1.2.12 Knochenmatrix

Die Knochenmatrix setzt sich aus einem organischen (Kollagenfasern und einer glykosaminreichen Grundsubstanz) und einem anorganischen Anteil (Mineralstoffe) zusammen. Die Kollagenfasern (Typ I) bilden mit ca. 90 % den Hauptanteil der organischen Knochengrundsubstanz. 1-2 % der Knochenmatrix werden von Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen gebildet. Zusammen mit Lipiden (5-10 %) bilden die Strukturproteine der Kollagenfasern ca. 1/3 der Trockensubstanz des Knochengewebes.

1.2.13 Periost

Die als Periost bezeichnete äußere Knochenhaut bedeckt Knochen ubiquitär bis auf die gelenksbildenden Flächen und Sehnenansätze.

Der wachsende Knochen unterteilt sich hier in 3 Schichten:

- *außen liegendes Bindegewebe (Adventitia)*
- *geflechtartiges straffes Bindegewebe (Fibroelastika)*
- *am Knochen anliegende Schicht (Osteoblastenschicht, Kambiumschicht genannt)*

Am Fibroelastikaübergang befinden sich mesenchymale Stammzellen, die zu Osteoprogenitorzellen/Kambiumzellen differenzieren. Aus diesen Kambiumzellen entstehen nun spindelförmige Präosteoblasten, die Zellverbände bilden. Umgangssprachlich werden die Osteoprogenitorzellen als Mutterzellen reifer Osteoblasten bezeichnet. Von den Osteoblasten dieser Schicht geht das appositionelle Dickenwachstum aus.

Ausdifferenzierte Knochen besitzen diese 3 Schichten nicht mehr und das Periost besitzt nur noch wenige „ruhende bzw. inaktive“ Präosteoblasten. Diese haben jedoch die Potenz, sich im Bedarfsfall zu entwickeln und die Knochenbruchheilung durchzuführen.

Ernährt werden die Knochenzellen, die im Periost liegen, durch die vasa nutritiva welches ausserdem als sehr schmerzempfindlich gilt, da es von zahlreichen markhaltigen und marklosen Nervenfasern durchzogen ist.

Peptiderge Nerven wurden in den tiefen Regionen des Periost gefunden, welche mit der Substanz P interagieren. Ungewiss ist allerdings, ob Knochengewebe selbst über Schmerzrezeptoren verfügt.

1.2.14 Endost

Endosteum (lat.) bezeichnet die so genannte „innere“ Knochenhaut. Sie überzieht die Oberflächen der Knochenbälkchen und der Markhöhle.

1.2.15 Geflechtknochen

Beim Geflechtknochen liegen die Kollagenfibrillen in Bündeln vor und sind ineinander verwoben. Diese Art von Knochen findet man überall dort, wo schnell Substanz aufgebaut werden muss (z.B. in der Entwicklung, bei einer Fraktur). (Koebke, 2005)

1.2.16 Lamellenknochen

Der Geflechtknochen wird jedoch im Laufe der Zeit zu Lamellenknochen (biomechanisch hochwertigeres Gerüst) umgebaut. Eine Knochenlamelle (3-5 μm dick) besteht aus gleich ausgerichteten mineralisierten Kollagenfibrillen. Von einer Lamelle zu nächsten, wechselt die Verlaufsrichtung der Kollagenfibrillen, was dem Knochen seine Festigkeit verleiht. Zwischen den einzelnen Lamellen befinden sich die Osteozyten. Lamellen, die sich konzentrisch um einen Havers'schen Kanal anordnen, nennt man Speziallamellen. Zusammengefasst nennt man dieses Gebilde ein Osteon. (Koebke, 2005)

1.2.17 Knochenentwicklung allgemein

Die Knochenentstehung liegt im Mesenchym. Letztere entwickeln sich stets aus bereits vorhandenem Binde- oder Stützgewebe.

Die desmale und chondrale Knochenentwicklung läuft prinzipiell gleich ab:

Osteoblasten bilden eine Extrazellulärmatrix, das Osteoid. Osteoid besteht zu 95% aus Typ I Kollagen und Glykoproteinen. Dieses wird anschließend mineralisiert.

Zunächst entsteht ein Geflechtknochen, welcher primäre Spongiosa ausbildet. Diese ungeordneten Trabekel unterliegen nun Umbauvorgängen durch mechanische Belastung, welche am Ende dann trajektorieell ausgerichtet sind. Auf diese Weise entsteht der Lamellenknochen. (Renz-Polster, et al., 2008)

Während des Wachstums behalten die Skelettelemente ihre äußere Form. Längenwachstum erfolgt durch interstitielle Zellvermehrung im Bereich der Wachstumsplatte. Das Breitenwachstum geschieht durch appositionellen Anbau von Knorpelzellen aus dem Perichondrium. Dieses Beibehalten der Form während der Wachstumsphase ist nur durch ständigen Umbau (siehe Remodeling 1.2.21) der Knochenstruktur zu gewährleisten. In dieser Phase werden Geflechtknochen in Lamellenknochen umgewandelt. Ab dem 8. Fetalmonat treten die ersten so genannten Osteone zum Vorschein. Der Harvers'sche Umbau, welcher in dem 7. und 12. Lebensjahr stattfindet, baut dann den primären Osteonknochen zum sekundären Osteonknochen um.

1.2.18 Desmale Osteogenese

Osteogenesis membranacea, die direkte Knochenbildung, bedeutet, dass sich Knochengewebe direkt aus embryonalem Bindegewebe bildet.

1.2.19 Chondrale, kartilaginäre Osteogenese

Der größte Teil des Knochen entwickelt sich aber indirekt über Knorpelgewebe (enchondrale Osteogenese).

Aus dem Mesenchym entsteht ein knorpeliges Skelettelement (Primordialskelett), welches schon die endgültige Form besitzt. Daraus entwickelt sich dann Knochengewebe. (Renz-Polster, et al., 2008)

1.2.20 RANKL/RANK – OPG-System

RANK steht für **R**eceptor **A**ctivator of **NF** **k**appa B. Dieses Protein wird an der Oberfläche von Osteoklasten exprimiert. Der natürliche Ligand von RANK ist RANKL, welcher von Osteoblasten gebildet wird. RANKL wurde 1997 entdeckt und gehört in die Gruppe der **T**umornekrosefaktoren (TNF). RANK/RANKL Bindung reguliert die Osteoklastenaktivität bzw. deren Differenzierung aus Makrophagen. Antagonisiert wird RANKL durch **O**steoprotegerin (OPG), welches als so genannter „Fangrezeptor“ bezeichnet wird. Viele Untersuchungen belegen die Bedeutung von Störungen des OPG/RANK/RANKL Systems bei der Pathogenese metabolischer Knochenerkrankungen.

Östrogenrezeptor-Agonisten, wie zum Beispiel 17- β Östradiol, Raloxifen, und Genistein stimulieren die osteoblastäre Produktion von OPG durch Aktivierung von Östrogenrezeptor Alpha in vitro, während Lymphozyten von Patientinnen mit Östrogenmangel RANKL überexprimieren.

Parenteral gegebenes OPG vermag den Knochenabbau im Osteoporose Tiermodell zu verhindern. Glukocorticoide und Immunsuppressiva steigern die RANKL

Expression und inhibieren die OPG Produktion in Osteoblasten in vitro. (Hofbauer, 2004)

Östrogene werden auch als Suppressor von RANKL erwähnt, was bei Frauen die postmenopausale Osteoporose erklären könnte. (Rosen, 2003)

1.2.21 Bone remodeling

Knochen sind keineswegs starre Gebilde. Sie unterliegen einem ständigen Aufbau und Abbau. Dieser Vorgang, welcher auch noch nach der Wachstumsphase stattfindet, wird „Bone remodeling“ bezeichnet. Die jährliche Umbauquote eines durchschnittlichen Menschen im mittleren Erwachsenenalter macht 10%, bezogen auf das Gesamtskelett, aus.

Nach B. Kummer, (Kopsch, 2003) verhält sich die osteoblastische und osteoklastische Aktivität ähnlich wie ein Reglersystem, welches sensibel auf Knochenbeanspruchung, beziehungsweise Schwerkraft, reagiert.

Minderbeanspruchung kann zu Knochengewebstrophie führen, was zum Beispiel bei längerer Immobilität, wie einem Beinbruch, der Fall ist. Als Beispiel für die Auswirkungen der fehlenden Gravitation stehen, begleitet von hohem Knochenabbau, Astronauten, welche längere Aufenthalte im All hinter sich haben.

Die normale „physiologische“ Abnahme (Osteopenie) beträgt ca. 1% und tritt erst im hohen Lebensalter auf. Erwähnenswert ist auch, dass der Mensch ca. bis zu seinem 35. Lebensjahr an Knochenmasse aufbaut, und dann kontinuierlich abbaut. (Kopsch, 2003)

1.2.22 Rachitis und Osteomalazie

ad Rachitis (griechisch *rhachis*, Wirbelsäule):

Bei Rachitis (auch englische Krankheit genannt) handelt es sich um eine Mineralisationsstörung und Desorganisation der Wachstumsfugen bei Kindern. Ursache ist eine erniedrigte Calcium-Phosphat Konzentration im Blut. Unterschieden werden einerseits die häufige Calciummangel - Rachitis und andererseits die seltene Phosphatmangel - Rachitis.

Die Behandlung richtet sich nach der Ursache und besteht aus Vitamin D Substitution und gegebenenfalls Calcium, beziehungsweise Phosphat.

Säuglingen sollte im 1. Lebensjahr täglich eine prophylaktische Einzeldosis (500 I.E.) verabreicht werden.

Ad Calciummangel-Rachitis:

Häufigste Ursache stellt die Vitamin D Unterversorgung in Kombination mit ungenügender Sonnenexposition dar. Eine weitere Möglichkeit ist ein angeborener Enzymdefekt, wobei die Vitamin D₃ Produktion gestört ist. Zöliakie, Mukoviszidose und Phenobarbital bzw. Phenytoin können ebenfalls die Calciumaufnahme vermindern und Symptome verursachen.

Ad Phosphatmangel-Rachitis:

Ursächlich ist eine erhöhte Phosphatausscheidung in den Nieren. (Hypophosphatämische Rachitis)

Die Symptome einer Rachitis gehen von Miliaria (Ausschlag), über Obstipation, Knochenerweichung, bis hin zur Tetanie. Knochenverkrümmungen und verzögerten Zahndurchbruch findet man jedoch nur bei im Wachstum befindlichen Personen, da bei adulten Menschen die Wachstumsfugen bereits verschlossen sind, kommt es lediglich zu einer Osteomalazie. (Kopsch, 2003)

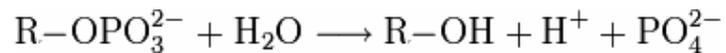
Diagnostiziert kann die Krankheit mittels Röntgenbild bzw. einer erhöhten alkalischen Phosphataseaktivität werden. (Schnabel, 2005)

Ad Alkalische Phosphatase:

Knochenspezifisch auch als „Ostase“ bezeichnet, handelt es sich um ein Phosphorsäureester hydrolysierendes Enzym = Hydrolase.

In Abbildung 3 wird die Entstehung von Phosphat, Alkohol und Protonen veranschaulicht.

Abbildung 3: alkalische Phosphatase



Dephosphoryliert werden Proteine, Nukleotide und Alkaloide. Die höchste Effektivität liegt bei alkalischem pH-Wert vor.

Beim Menschen unterscheidet man zwischen 15 verschiedenen Isoenzymen, wobei in der Labordiagnostik (Blut) die Gesamtheit als „alkalische Phosphatase“ bezeichnet wird. Zur Beurteilung der Osteoklastenaktivität dient die Bestimmung der sauren Phosphatase, wohingegen die Osteoblastenaktivität mittels alkalischer Phosphatase bestimmt wird. (Neumeister, et al., 2003)

Ein erhöhter AP Wert zeigt erhöhte Osteoklastenaktivität und deutet auf Morbus-Paget, Knochentumore, Knochenmetastasen, Rachitis, Hyperparathyreoidismus, Niereninsuffizienz, oder Leber-/Gallenerkrankungen hin.

Erniedrigte AP kommt nur sehr selten vor, wie zum Beispiel bei angeborener Hypophosphatasämie, Morbus Wilson, Anämie und Hypomagnesiämie.

In diesem Bereich sei außerdem die saure Phosphatase erwähnt, welche eine wichtige Rolle im Bereich der Apoptose spielt, bei saurem pH optimal arbeitet und früher bei Verdacht auf Prostatakarzinom bestimmt wurde. (Schaenzler, 2000)

Ad Osteomalazie:

Bezeichnet eine dumpf anhaltend schmerzhafte Knochenerweichung beim erwachsenen Menschen, der ein Vitamin D Mangel zugrunde liegt. Histologisch handelt es sich um ein Ungleichgewicht der weichen Knochenmatrix zum mineralisierten Knochen. Gründe können vielschichtig sein, wobei die wichtigsten der oben erwähnte Vitamin D Mangel, renale Funktionsstörung, Phosphatasemangel, Fluorid- bzw. Fumadermtherapie sein können. Begleitend zur Knochenerweichung tritt meist auch eine Muskelschwächung auf. Diese führt unweigerlich zu einem hohen Frakturrisiko speziell im Bereich des Oberschenkelhalses. Die Behandlungsmethoden der Osteomalazie sind Calcium- bzw. Phosphat- und Vitamin D-Substitution. Sonnenbäder und Lebertran erhöhen ebenfalls den Vitamin D Spiegel. (Holick, 2007)

1.2.23 Osteoporose und deren Therapie

Die durch Störungen des Knochenstoffwechsels und einer daraus resultierenden lokalen, bzw. generalisierten Abnahme der Knochenmasse pro Volumeneinheit wird als Osteoporose bezeichnet. Folge davon ist eine Beeinträchtigung der Mikroarchitektur des Knochengewebe und diese Strukturveränderungen führen zu einem erhöhtem Frakturrisiko.

Die Prävalenz in Deutschland beträgt zwischen 4-6 Mio. und davon 80% Frauen.

→Einteilung der Osteoporose:

0 Osteopenie, 1 präklinische Osteopenie, 2 manifeste Osteoporose, 3 fortgeschrittene Osteoporose

Unterschieden wird zwischen einer primären (juvenilen) Osteoporose und einer sekundären Form.

Die juvenile tritt schon in der Pubertät auf, heilt spontan aus und ihre Ursache ist noch unbekannt.

Viel häufiger tritt allerdings die postmenopausale Osteoporose (TypI) bei der Frau auf. Sistierung der Ovarienfunktion nach der Menopause bedingen einen

Estrogenabfall, welcher wiederum eine gesteigerte Osteolyse durch verringerte Sekretion von Calcitonin und Sensibilisierung der Osteoklasten gegen Parathyrin bewirkt. Daraus ergibt sich, dass der Blutcalciumspiegel extrazellulär steigt und der Calcitriolspiegel sinkt.

Bei der senilen Osteoporose (TypII) nimmt die Knochenmasse in der Kompakta als auch Spongiosa stetig ab. Anzunehmen ist eine genetische Disposition bzw. ein erniedrigter Calcitriolspiegel im Plasma. Des Weiteren nehmen ältere Personen häufig zuwenig Vitamin D auf, welche eine Calcitriolvorstufe darstellt.

Die sekundären Osteoporoseformen (ca. 5%) beruhen auf endokrinen Störungen wie zum Beispiel Hyperthyreose oder Hypercortisolismus, Immobilisation, Glukokortikoidbehandlung über einen längeren Zeitraum und Mangelernährung führen ebenfalls dazu.

Es ist bekannt, dass durch Bewegung – sowohl Kraft- als auch Ausdauertraining – die Knochenmasse in jedem Lebensalter um etwa 5 % gesteigert werden kann, da sie das Ergebnis eines dynamischen, belastungsabhängigen Regulationsvorgangs ist.

Osteoporoseprävention sollte daher einerseits aus regelmäßiger Bewegung und andererseits aus calciumreicher Ernährung bestehen. Die empfohlene tägl. Calciumzufuhr beträgt 1000-2000 mg. Älteren Patienten sollte zusätzlich 800 IE Vitamin D₃ verschrieben werden. Bei Verdacht auf Osteoporose sollte eine Knochendensitometrie durchgeführt werden. Diese Methode dient der Quantifizierung des Knochenmineralgehaltes wobei DEXA (Dual Energy X-Ray Absorptiometrie) bzw. QUS (Quantitative Ultraschallmessung) die wichtigsten Verfahren darstellen. Das Ergebnis dieser Knochendichtemessung stellt der T-Wert (T-Score) dar. Dieser Wert bezeichnet die Differenz des Patientenwertes zum Mittelwert junger gesunder Erwachsenen in Standardabweichungen.

Werte von -1 bis -2,5 bedeuten eine Verminderung des Knochenmineralgehaltes, sprich Osteopenie. Unterhalb von -2,5 spricht man von Osteoporose.

Prinzipiell sinnvoll ist eine solche Untersuchung bei klinischem Verdacht auf Osteoporose, Frauen in der Menopause und bei Personen über 65 Jahre wobei eine Messung ca. alle 2 Jahre empfehlenswert ist.

Als therapeutische Maßnahmen, wobei das wichtigste Ziel die Senkung des Frakturrisikos ist, werden heute folgende Arzneistoffe eingesetzt:

1) Fluoride (*Natriumfluorophosphat, Natriumfluorid*):

Diese Therapie ist sehr umstritten und sollte nicht mehr zur Anwendung kommen. Deshalb wird Fluorid nur noch der Vollständigkeit halber erwähnt.

Fluorid wird anstelle von Hydroxylapatit in den Knochen eingebaut. Es stimuliert die Osteoblastenproliferation und die Matrixsynthese. Seine Wirkung beruht auf einer Inhibition der Osteoblastenphosphotyrosylphosphatase wodurch die Aktivität der p44 MAPK erhöht wird.

Nebenwirkungen sind Magenschmerzen, Schwellungen und Schmerzen in den Gelenken. Bei Leber und Niereninsuffizienzen, Osteomalazie und im Kindesalter sind Fluoride kontraindiziert.

Eine unerwünschte Wirkung ist jedoch, dass zwar Knochenmasse aufgebaut wird, dieser jedoch aufgrund veränderter Kristallstruktur sehr spröde und schwach belastbar ist.

2) Bisphosphonate (*Clodronat, Alendronat, Ibandronat, Pamidronat, Zoledronat*):

Diese Stoffgruppe besitzt eine P-C-P Struktur und zählt zu den Pyrophosphat Analoga. Sie greifen wie Pyrophosphat an mehreren Stellen in den Calciumstoffwechsel ein. Pyrophosphat alleine wird nicht in der Therapie genutzt, da es durch rasche Hydrolyse zu Phosphat wird. Deshalb verwendet man eine Reihe von Bisphosphonatderivaten, wie nicht basisch substituierte, Amino-, N-substituierte-, und Bisphosphonate mit basischem Heterocyclus.

Sie alle hemmen die Osteoklastentätigkeit durch Inhibierung der OC Anheftung an die Knochenstrukturen und blockieren somit die Calciumfreisetzung. Zusätzlich unterdrücken sie die Tumoradhäsion an der Knochenmatrix und reduzieren somit tumorbedingte Osteolysen und Hyperkalzämien. Bisphosphonate helfen ebenfalls beim normalen Calciumeinbau. Das Wirkprofil ist bei allen Bisphosphonaten ident,

sie unterscheiden sich meist nur in der Wirkstärke und Pharmakokinetik. Alendronat reduziert zum Beispiel bei postmenopausalen Frauen mit mindestens einer Wirbelfraktur nach 3 jähriger Therapie die Frakturinzidenz um 50% gegenüber einem Placebo.

Bisphosphonate werden schlecht resorbiert, jedoch beträgt die Halbwertszeit im Knochen Monate bis Jahre.

Indiziert sind sie bei Osteoporose, Morbus-Paget, palliative Therapie und Hyperkalzämien.

Einnahme erfolgt nüchtern bei aufrechtem Oberkörper. Bis auf gastrointestinale Beschwerden sind die Bisphosphonate gut verträglich. Kontraindiziert sind sie bei Niereninsuffizienz. (Mutschler, 2001, 8. Auflage)

3) Rekombinantes Parathormon (Teriparatid):

Hierbei handelt es sich um eine rekombinate Form des nativen **Parathormons** (PTH) bestehend aus den ersten 34 N-terminalen Aminosäuren, welche biologisch am aktivsten sind. Teriparatid wird als knochenanabole Substanz bei einer fortgeschrittenen Osteoporose verabreicht.

Primäre Zielzelle für Parathormon ist der Osteoblast. Hier wird das Hormon über den Typ-I-PTH/PTHrP-Rezeptor gebunden und löst über eine Aktivierung von Signaltransduktionsmechanismen die weiteren Effekte aus. Anschliessend wird die Produktion von verschiedenen Wachstumsfaktoren wie IGF-1, IGF-2 und TGF- β stimuliert. Nach wenigen Tagen intermittierender PTH-Gabe findet man eine Transformierung von ruhenden Knochenbelegzellen in aktive Osteoblasten. Die Substanz wird subkutan in fixer Dosierung (20 μ g/Tag) verabreicht (mittels Pen).

Gemäß der Datenlage ist die Therapiedauer auf 18 Monate beschränkt und muss von einer antiresorptiven Therapie gefolgt sein, will man die neue Knochenmasse erhalten. Die relative Reduktion der Frakturrate neu aufgetretener Wirbelfrakturen betrug 65 %, die Reduktion multipler Wirbelkörperfrakturen sogar 73 %. Die Zahl der nicht vertebrealen Frakturen war zu klein, um auf die Wirksamkeit der Substanz

an verschiedenen Frakturlokalisationen zu schließen. Um eine Bewilligung für eine Kostenübernahme einer Parathormontherapie von den Krankenkassen zu erhalten, muss ein Non-responder-Status einer bereits bestehenden Standardtherapie nachgewiesen werden. Das heißt, der Patient muss gegenwärtig eine frische Fraktur oder einen signifikanten Abfall der Knochendichte unter einer dokumentierten antiresorptiven Therapie aufweisen. (Resch, 2004)

4) SERMs (Selective Estrogen receptor modulator):

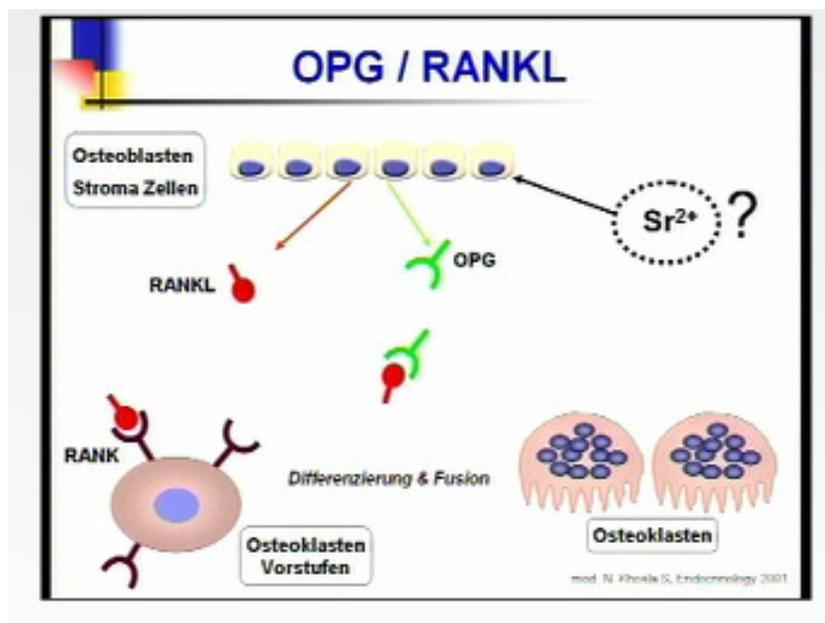
Derzeit ist Raloxifen 60 mg/Tag oral zur Therapie postmenopausaler Frauen mit Osteoporose zugelassen und hat hier in der Therapie und Prophylaxe vertebraler Frakturen signifikante Ergebnisse erzielt. Angriffspunkt des Arzneistoffes ist der Östrogenrezeptor (ER), wobei beide Subtypen (α und β) hoch affin gebunden werden. Die Wirkung ist antagonistisch und führt zu einer Hormonmangelsymptomatik. Darüber hinaus wirkt die Verbindung aber auch partiell agonistisch. Raloxifen ist sehr gut verträglich und es sind kaum UAW (z.B. Hitzewallungen, Wadenkrämpfe, Thromboembolien, Ödeme) bekannt. Konträr zur Hormonersatztherapie (HRT) hat Raloxifen keinen Einfluss auf den Uterus und das kardiovaskuläre System. Die Wirkung entfaltet sich dadurch, dass die Knochenresorption vermindert wird, und so eine verbesserte Calciumbilanz entsteht. Verglichen mit Bisphosphonaten steigt die Knochenmasse aber nur in geringem Ausmaß. Im Rahmen der MORE-Studie (Multiple Outcomes of Raloxifen Evaluation) wurde die Raloxifentherapie auf das vertebrale und nicht vertebrale Frakturrisiko untersucht.

Das Frakturrisiko sank bei einer 36 Monat Therapie (60mg/Tag) Raloxifen um 30-55% im Vergleich zur Placebogruppe. (Fahrleitner, 2007), (Seifert, 2003)

5) Strontium (Protelos):

Hierbei handelt es sich um das Di-Strontium-Salz der Ranelicsäure, einer Tetracarbonsäure. Strontiumranelat hemmt die Osteoklastendifferenzierung und fördert die Knochenformation (dualer Wirkmechanismus) durch Erhöhung der Lebenszeit der Osteoblasten. Das Ergebnis ist eine deutlich besserer Knochenqualität (structural model index erhöht sich). Ein gesicherter Angriffspunkt ist der calciumsensitive Rezeptor (CaSR) (siehe Abbildung 4) und ein noch unbekannter kationensensitiver Rezeptor.

Abbildung 4: OPG/RANKL System



Die Substanz selbst wird peroral in einer Dosierung von 2 g/täglich verabreicht. Nebenwirkungen sind schwere Überempfindlichkeitsreaktionen und das Stevenson-Johnson-Syndrom. (Dimai, 2007), (Resch, 2004)

6) Calcitonin

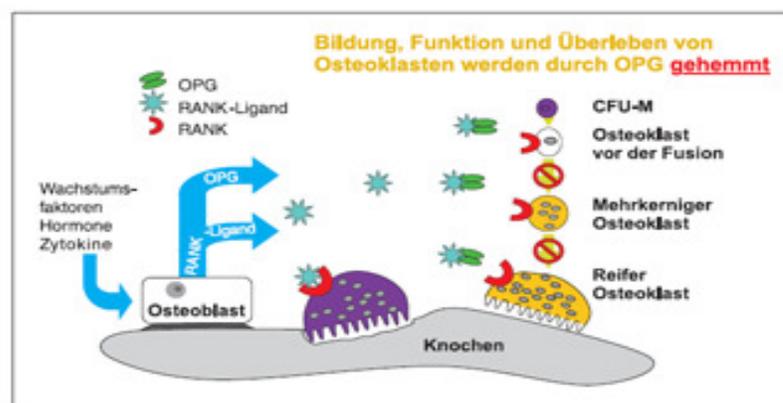
Gegenwärtig stehen in Österreich ein intranasal zu applizierender Lachs-Calcitonin-Spray (Salm-Calcitonin), subkutan zu applizierende Lachs-Calcitonine sowie ein subkutan zu applizierendes synthetisches Aal-Calcitonin-Derivat zur Verfügung.

Nasalsprays werden in der Dosis von 200 I.U. täglich verabreicht. Zu berücksichtigen ist, dass die positiven Effekte auf Knochendichte und vertebrales Frakturrisiko unter einer Dosierung von 200 I.U. täglich und kontinuierlich erzielt wurden. Auch nach 5 jähriger Therapie scheint sich dieser Effekt zu bestätigen. Eine Reduktion des Schenkelhalsfrakturrisikos konnte bislang allerdings nicht schlüssig nachgewiesen werden. (Resch, 2004)

7) humane monoklonale Antikörper (IgG₂) Denosumab:

Früher bezeichnet als AMG 162 wirkt Denosumab durch Blockierung des RANK Liganden und führt so zu einer stark verminderten Osteoklastogenese. In einer abgeschlossenen Phase II Studie konnte nach 12 monatiger Therapie ein Anstieg der Knochendichte in der Lendenwirbelsäule und im proximalen Femur nachgewiesen werden. Schwere UAWs zeigten sich nicht. (siehe Abbildung 5) (Preisinger, 2007)

Abbildung 5: Wirkungsweise von Osteoprotegerin



(Preisinger, 2007)

1.3 Knochenresorption

Im Remodelingprozess wird der Knochen als dynamisches Organ kontinuierlich auf- und wieder abgebaut. Osteoklasten, welche sich bekanntlich aus hämatopoetischen Vorläuferzellen differenzieren, besitzen nun die Fähigkeit den Knochen mittels lytischer Enzyme und Pro-Cathepsin K zu resorbieren. Bei diesem Vorgang entstehen Howship'sche Lakunen. Die Schlüsselrolle bei der Entstehung und Resorption trägt RANKL (ein Abkömmling der TNF Oberflächenproteine). Als transmembranes Protein vom Typ II wird es primär auf Osteoblastenoberflächen exprimiert. RANK-RANKL Bindung führt zur Präosteoklastenreifung.

(Preisinger, 2007)

1.4 Die MAP-Kinasen, allgemein

Sämtliche Lebewesen, von einzelligen Prokaryoten bis hin zu höheren Eukaryoten, müssen bestimmte Signale in ihrer Umwelt wahrnehmen und spezifisch auf diese reagieren können. Die Verbindung zwischen extrazellulären Signalen und Reaktion der zellulären Maschinerie wird über Rezeptorsysteme und Signaltransduktions-Kaskaden bewerkstelligt.

So verknüpft einer der grundlegenden Signaltransduktionsstränge Signalwege über intrazelluläre Konzentrationsänderungen des ‚second messenger‘ cAMP; diese Signalwege können beispielsweise G-Protein-gekoppelte Rezeptorsysteme und Proteinkinase A (PKA) als Komponenten besitzen.

Ein Beispiel für basale eukaryotische Signaltransduktion ist durch so genannte Mitogen-Aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) gegeben.

Die MAPK Kaskade besteht aus 3 sequentiell agierenden Proteinkinasen (siehe Abbildung 6), die jeweils durch Phosphorylierung an bestimmten Aminosäurenresten aktiviert werden. Die Aktivierung einer MAP Kinase verläuft über einen Stimulus → MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK) über eine MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) zur MAP-Kinase (MAPK) → und führt schließlich zur Signaltransduktion. Auf jeder

Stufe der Proteinkinase Kaskade ist eine positive oder auch negative Regulation möglich.

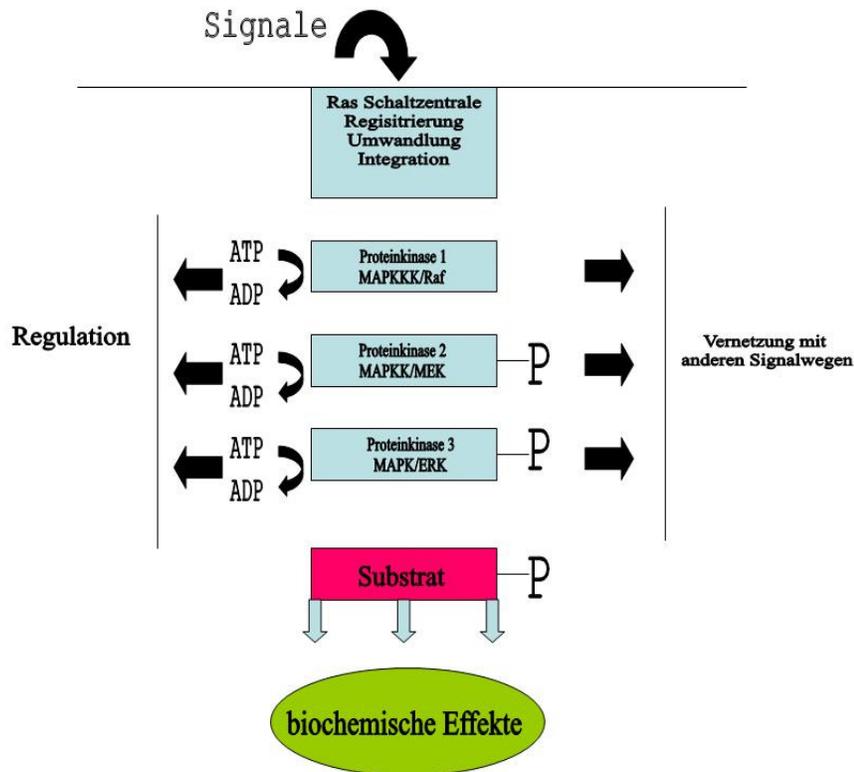
Bei den Schlüsselementen dieser Kaskaden handelt es sich um cytoplasmatische Proteinkinasen, welche aufgrund ihrer Regulationsfähigkeit als mitogen (=zellteilungsfördernd) wirkende Liganden bzw. als **Mitogen-aktivierte Proteinkinase** oder auch als **extrazellulär regulierte Kinase** (=ERK) bezeichnet werden.

Diese mehrstufigen Signaltransduktionswege besitzen eine bedeutende Rolle in der Embryogenese, der Zelldifferenzierung und der Apoptose.

Bei den MAP-Kinasen selbst handelt es sich um kleine Proteinkinasen mit einer molaren Masse zwischen 36 und 44 kDalton. Sie besitzen die Fähigkeit andere Proteine an Serin bzw. Threoninresten zu phosphorylieren. Die G-Protein vermittelten intrazellulären Signalwege dieser proliferativen Effekte sind allerdings momentan noch relativ schlecht verstanden. (Moolenaar, 1991)

In aktiviertem Zustand akkumulieren sie intrazellulär im Zellkern, wo sie dann kerneigene Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und so die Transkription regulieren.

Abbildung 6: Prinzip der Signalübertragung durch intrazelluläre Proteinkinase Kaskaden



Legende zu Abbildung 6: Die wichtigsten Schritte der MAP Kinase Kaskade, wobei P für das Phosphat steht.

MAP-Kinasen Kaskaden können aktuell bei Säugetierzellen in 3 verschiedene Gruppen eingeteilt werden:

- 1) Die (*extracellular signal-related kinase*)- ERK-1 bzw. ERK-2 Kaskade
- 2) Die P38 MAP Kinasen
- 3) Die „stress activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase“ JNK-Kaskade

Ziel dieser Stoffwechselwege ist die teilweise überlappende Regulation von Transkriptionsfaktoren, welche zur Aktivierung von so genannten „rapid response genes“, besonders der Mitglieder der fos- und jun-Familie der Proto-Onkogene führt. (Hipskind und Bilbe, 1998)

Genistein steht als Beispiel für eine nichtspezifische Rezeptortyrosinkinase. Man fand heraus, dass es die MAPK Aktivität hemmt. (Hordijk, et al., 1994)

Ad 1) Bisher bekannt sind 8 verschiedene Typen ERK 1-8.

Initiiert wird diese Kaskade durch Lipidanlagerung an den beteiligten Zellrezeptoren. (Seger und Krebs, 1995)

Die ERK Kaskade wird durch die Ras Proteine eingeleitet, welche durch 3 verschiedene Rezeptortypen aktiviert werden können. Dies sind Rezeptoren mit assoziierter Tyrosinkinase, Rezeptor Tyrosinkinasen und G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Wissenschaftliche Beweise für die Aktivierung gibt es bereits für Wachstumsfaktoren, wie den epidermal growth factor (EGF), den platetet derived growth factor (PDGF), den insulin like growth factor (IGF) und den nerve growth factor (NGF). Sie alle aktivieren durch die Bindung an die Rezeptor Tyrosinkinase an unterschiedlichsten Zellen. (Chaudhary und Avioli, 1997)

Auf diesem Weg reguliert die ERK Kaskade Prozesse wie Zelldifferenzierung und Proliferation.

Ad 2)

Stress, Tumornekrosefaktoren oder Interleukin I aktiviert p38/MAPK- ϵ/β , was zu Entzündung, Apoptose, Wachstum oder Differenzierung führt. Bekannt sind momentan 4 Isoformen des Enzyms. (Pearson, et al., 2001), (Seger und Krebs, 1995)

Ad 3)

Bei JNK und SAPK handelt es sich um stark konservierte Proteine mit Kinasefunktion (Transferasen). Am Beginn einer Signalkaskade stehen Stressfaktoren, wie UV-Strahlung, Chemokine und entzündliche Interleukine (IL-1). (Paul, et al., 1997)

Unterteilt werden sie in 3 Untertypen mit insgesamt 10 Isoformen. Die einzelnen Isoformen sind für die Phosphorylierung anderer Proteine verantwortlich, wobei einige davon ein so genanntes „Scaffold“- Protein zur Ausübung ihrer Funktion benötigen.

JNKs besitzen als Substrat den Transkriptionsfaktor c-Jun. Sie binden an die N-terminale Transaktivierungsdomäne des c-Jun Proteins und phosphorylieren die Serinreste 63 und 73. Folge davon ist eine erhöhte Transkriptionsaktivität in den Genen. Ebenfalls kontrolliert werden die Faktoren Elk-1 und ATF-2.

MKK4 und MKK7 konnten bis jetzt als MAP Kinase Kinase identifiziert werden. Auf MAPKK Kinaselevel die MEKKs 1-4, wobei diese durch die regulatorischen GTPasen Rac-1 und Cdc42 (zur Ras Superfamilie gehörend) aktiviert werden. (Hipskind und Bilbe, 1998)

Man schreibt den JNKs wichtige Rollen in vielen physiologischen Prozessen zu. (Waetzig und Herdegen, 2005)

1.5 Die „extracellular signal regulated kinase“ – ERK Kaskade

Beim MAPK/ERK Signalweg handelt es sich um einen sehr komplexen Signaltransduktionsweg mit einer großen Anzahl an Proteinen.

Die Hauptschritte sind in Abbildung 7 angeführt, wobei das „P“ für Phosphat steht.

Aktivierung dieses Signalweges bedeutet meist Zellteilung und er stellt die Kopplung zwischen Wachstumsfaktoren und Zelloberflächenrezeptoren her. (Orton, et al., 2005).

Rezeptorgebundene Tyrosinkinasen, EDGFR (epidermal growth factor receptor) werden durch extrazelluläre Liganden aktiviert. Kommt es zur Bindung, wird EDGFR am Tyrosin phosphoryliert. Verschiedene Docking Proteine, wie GRB2 enthalten SH2 Domänen welche an diese phosphorylierten Stellen des aktiven Rezeptors binden können. (Schulze, et al., 2005)

Sobald GRB2 an den Guanin Nukleotid Austausch Faktor SOS bindet, dockt der Komplex an den phosphorylierten EGFR und SOS wird aktiviert. (Zarich, et al., 2006)

Aktiviertes SOS fördert die Abspaltung von GDP von Ras. Ras kann somit an GTP binden und aktiv werden.

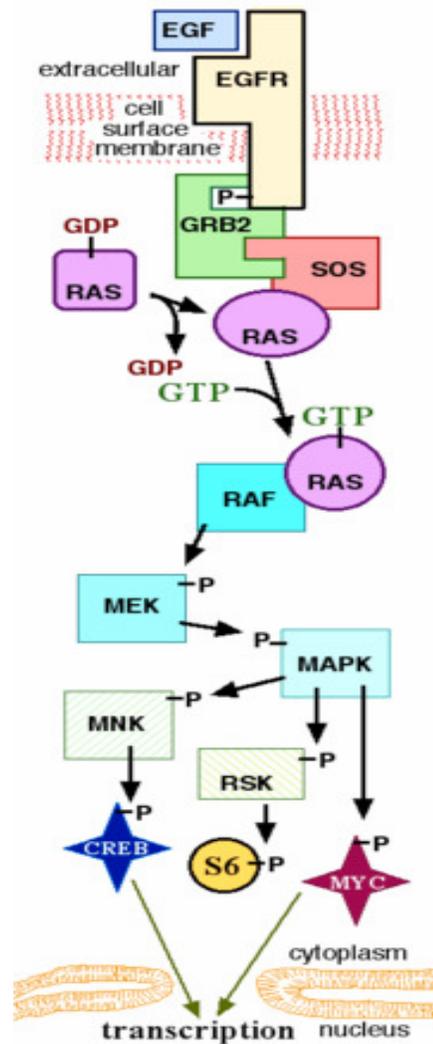
Aktiviertes Ras kann die Proteinkinaseaktivität von RAF Kinase, welche eine Serin/Threoninselektive Proteinkinase ist, initiieren. (Zarich, et al., 2006)

Die RAF Kinase phosphoryliert und aktiviert MEK, welches wiederum phosphoryliert wird und dann die MAPK aktiviert.

Durch MAP Kinase Aktivierung kommt es zu einer Änderung der Translation von mRNA zu Proteinen. Die 40S RSK (ribosomale Proteikinase S6) wird durch die MAPK phosphoryliert. (Avruch, et al., 2001)

Auf diesem Weg reguliert die MAPK die Aktivität von diversen Transkriptionsfaktoren c-Myc, CREB und das Fos-Gen.

Abbildung 7: MAPK/ERK Signalweg



Legende zu Abbildung 7: Hauptschritte der MAK/ERK Kaskade.

1.6 Die Ras Proteine

Bei den Ras Proteinen handelt es sich um die wohl am besten untersuchten wachstumsregulierenden Signalproteine. Der Nachweis erfolgte in Rattensarkomen (rat sarkoma), welche durch Retroviren ausgelöst wurden.

Es stellte sich heraus, dass 30% aller humanen Tumore eine Mutation im Ras Gen aufweisen. Ras Proteine sind regulatorische GTPasen, welche in inaktiver GDP oder aktiver GTP Form existieren können, wobei der inaktive Ras-GDP Komplex sehr stabil ist und nur langsam dissoziiert.

Der **G**uanin-Nucleotid-**A**ustausch**f**aktor (GEF) zum Beispiel beschleunigt die Abdissoziation des gebundenen GDP, und die **G**TPase-**a**ktivierenden **P**roteine (GAP) verkürzen somit die aktive Phase der RAS Proteine. Zusammen mit den GEFs stellen die Adapterproteine die Bindung zwischen aktivierter Rezeptor Tyrosinkinase und den Ras Proteinen her.

Säugetiere besitzen das Adapterprotein Grb2 (= **g**rowth factor receptor **b**inding protein 2), welches in einem stabilen Komplex mit dem Nukleotidaustauschfaktor vorliegt und auch als SOS Protein bezeichnet wird (= **s**on **o**f **s**evenless).

Farnesyl- und Palmitylreste verbinden die Ras Proteine mit der Plasmamembran und bringen es nahe an die Raf-Kinase, welches ein nachgeschaltetes Effektormolekül ist. (Boguski und McCormick, 1993) Außer der Raf-Kinase können auch die MEK-Kinase, und GAP-Proteine mit den Ras Proteinen interagieren. (Burgering und Bos, 1995)

1.7 Die Raf Kinase

Hierbei handelt es sich um Serin/Threoninspezifische Kinasen, welche dem Ras Protein unmittelbar nachgeschaltet sind. Die Wechselwirkung zwischen aktiviertem Ras Protein und der Raf-Kinase vermittelt eine Membranlokalisation.

Der genaue Mechanismus ist noch unbekannt. Man nimmt aber an, daß weitere Cofaktoren zur Aktivierung nötig sind, wie zum Beispiel die **P**rotei**n**kinase **C** (PKC), welche ebenfalls die Raf-Kinase aktivieren kann. (Morrison, et al., 1993)

1.8 Die MEK Kinasen

Das Substrat von MEK1 und MEK2 kann MAP-Kinasen an einem Tyrosin und einem Threonin-Rest der Sequenz phosphorylieren, wohingegen die anderen Proteinkinasen entweder Tyrosin oder Serin/Theroninspezifisch sind. Aufgrund dieser Tatsache nennt man sie auch „dual specificity protein kinases“. (Seger, et al., 1991)

Die Aktivierung läuft durch vorgeschaltete Raf-Kinasen und ihrerseits kommt es zu einer Phosphorylierung der nachfolgenden MAP Kinasen.

1.9 Die p38 MAPKinase Kaskade

Die p38 MAP Kinase Kaskade wird durch Stress, wie Osmoseschwankungen, bakterielle Lipopolysaccharide und entzündliche Cytokine aktiviert. Parallel dazu wird auch häufig die JNK-Kaskade aktiviert.

CHOP, ATF-2, SAP-1a und ELK-1 sind die wichtigsten Substrate der p38 MAP Kinase. Durch die Effektorproteine MAPKAPKs 2 und 3 (MAP Kinase aktivierte Protein Kinasen) beeinflussen sie die Transkriptionsfaktoren CREB und HSP27. (Wang und Ron, 1996)

P38 Aktivierung erfolgt durch MKKs 3,4 und 6, allerdings gibt es im Bereich der p38 MAP-Kinasen noch großen Forschungsbedarf, da diese Kaskade durch viele unterschiedliche Signale aktiviert werden kann.

1.10 Das G-Protein gekoppelte Rezeptorsignalsystem

Diese Gruppe, der heterotrimeren GTP bindenden Proteine (G-Proteine), stellt die größte Gruppe von Zelloberflächenrezeptoren im Säugetiergenom dar (>1% des menschlichen Genoms). (Bargmann, 1998)

Bis jetzt sind ca. 20 verschiedene Säugetier G-Protein β Untereinheiten identifiziert, welche in 4 Gruppen (G_s, G_i, G_q, G_{12}) unterteilt werden. (Wilkie, et al., 1992)

Diese G-Protein β Untereinheiten regulieren die Aktivität von verschiedenen Second Messenger Systemen. (Rhee und Bae, 1997)

Vertreter von G_s aktivieren die Adenylylcyclase, wohingegen sie die G_i hemmen. (Sunahara, et al., 1996), (Taussig und Gilman, 1995), (Simonds, 1999)

Viele wichtige biologische Funktionen sind durch die G-Protein gekoppelten Rezeptoren geregelt, wie zum Beispiel Neurotransmission, endo/exokrine Drüsenfunktion, Blutdruck, Plättchenfunktion, Embryogenese, Geweberegeneration und abnormes Zellwachstum. (Yarden, et al., 1986)

Erwähnenswert ist außerdem, dass die Signalübertragung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren zur MAPK in einigen Zelllinien keine Aktivierung und Phosphorylierung von Src und Dynamin I benötigen. (Moolenaar, et al., 1997), (Kranenburg, et al., 1997)

Bestimmte Wachstumsfaktor Rezeptor Tyrosinkinase, wie zum Beispiel der PDGF Rezeptor oder der EGF Rezeptor, werden nach G-Protein gekoppelter Rezeptorstimulation am Tyrosin phosphoryliert und führen so zu MAPK Aktivierung. (Linseman, et al., 1995), (Daub, et al., 1996), (Daub, et al., 1997), (Cunnick, et al., 1998)

Wie genau die Wachstumsfaktor-Rezeptoren als Antwort auf G-Protein gekoppelte Rezeptoren Stimulation aktiviert werden ist noch relativ unklar.

Eine mögliche Hypothese wäre die Miteinbeziehung von Src und die Phosphorylierung von EGFR durch eine Nichtrezeptor Tyrosinkinase. (Luttrell, et al., 1997)

1.11 Der JNK Signalweg:

JNK (c-Jun amino-terminal kinases) oder p54SAPK (stress-activated protein kinase) setzen sich großteils aus den ubiquitär exprimierten Kinasen JNK1 und JNK2 sowie der nur in einigen Geweben exprimierten JNK3 zusammen.

Eine Aktivierung erfolgt ähnlich der p38MAPK durch Streß oder Zytokine über eine Vielzahl an MAP3K (Chen, et al., 2002) sowie im späteren Verlauf durch MKK4 und MKK7. Des weiteren ist auch eine Aktivierung durch *ras* möglich, der genaue Mechanismus ist jedoch noch unklar. (Chen, et al., 2000)

Ihre Wirkung entfalten die JNK-MAP-Kinasen u.a. über *c-Jun*, welcher Bestandteil des AP-1-Komplexes ist, und einen wichtigen Regulator der Genexpression, darstellt. (Johnson und Lapadat, 2002)

Auf diese Weise haben die JNK Einfluß auf die Expression bestimmter Zytokine, und sind ebenfalls in die Einleitung der Apoptose involviert. (Chang und Karin, 2001)

Reguliert kann die Spezifität der Signaltransduktion auf verschiedene Arten werden, wie etwa durch die Rezeptordichte an der Zelloberfläche, der Expression sogenannter ‚scaffold‘ - Proteine oder dem Zusammenspiel mit weiteren Kinasen und Phosphatasen. (Murphy und Blenis, 2006)

‚Scaffold‘-Proteine binden an verschiedene Komponenten der MAPK-Kaskade und gewährleisten so eine räumliche Nähe zwischen diesen Komponenten. (Pouyssegur und Lenormand, 2003)

1.12 Der PKB Signalweg

Proteinkinase B oder AKT, eine Serin/Threonin Kinase, kommt in einer großen Anzahl an Isoformen vor und spielt eine bedeutende Rolle in der Zellhomöostase. AKT1 (PKB α) wurde im Jahr 1991 entdeckt und wird ubiquitär in allen Eukaryonten exprimiert, im Gegensatz zu AKT3 (PKB γ), der nur geringem Ausmaß vorkommt.

Die AKT2 (PKB β) Isoform findet man vor allem in Insulin-sensiblen Gewebe. Eine regulierende Aufgabe im PI3/AKT Signalweg übernimmt die Phosphoinositid-Kinase (PI3K), welche durch die sekundären Botenstoffe PIP3 wirkt.

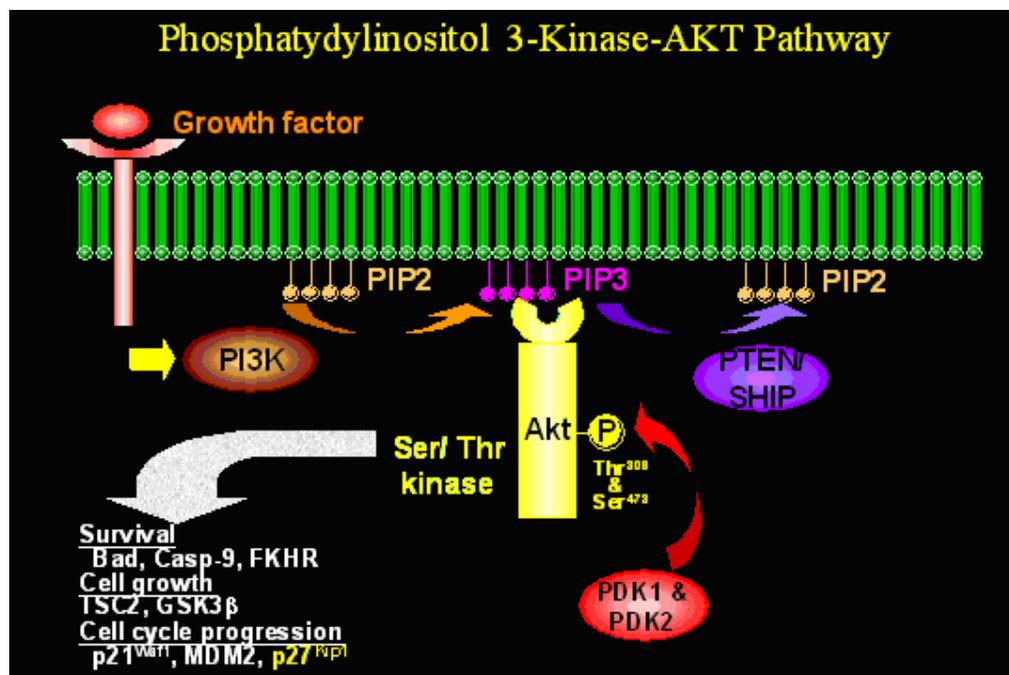
AKT bindet an PIP3 über eine PH-Domäne und wird dadurch an die Zellmembran rekrutiert. An dieser Stelle erfolgt eine Phosphorylierung, sprich Aktivierung durch die Kinase PDK1. Aktiviertes PKB kann nun in den Zellkompartimenten diverse

Substrate phosphorylieren. Phosphatase PTEN, ein Enzym, kann diesen Prozess inhibieren und gegenregulieren, indem es PIP3 dephosphoryliert. Bei PTEN handelt es sich darum um einen typischen Tumorsuppressor.

PKB reguliert also viele Funktionen des Metabolismus, der Apoptose und der Differenzierung.

Die Substrate der Proteinkinase B sind vielfältig zb.: (Bad, Forhead Transkriptionsfaktoren, Caspase 9, GSK 3-Beta, P21, p27 und HDM-2/MDM-2). (Bellacosa, et al., 2004), (Toker und Yoeli-Lerner, 2006)

Abbildung 8: PKB Signalweg



Legende zu Abbildung 8:

Quelle (http://werner.yellowcouch.org/Papers/cellsim05/CellSim2005_html_m526f2f92.png)

2 ZIELSETZUNG

Eine Vielzahl in Pflanzen vorkommender Verbindungen, wie etwa Furosin, Flavonoide, Genistein und Daidzein, welche in der Sojabohne vorkommen, besitzen die Fähigkeit, die Osteoklastendifferenzierung zu inhibieren und könnten so einen therapeutisch nutzbaren Effekt in der Osteoporosetherapie erlangen. Eui Kyun Park et al. beschreiben in dem Artikel „Furosin, an ellagitannin, suppresses RANKL-induced osteoclast differentiation and function through inhibition of MAP kinase activation and actin ring forming“, dass diese hydrolysierbaren Tannine die Differenzierung von RAW 264.7 Zellen in Osteoklasten und deren Funktion hemmen.

Furosin hemmt beispielsweise die RANKL und M-CSF induzierte Osteoklastendifferenzierung (bei 10 µg/ml) und Osteoklastenfunktion, zeigt jedoch keine Zytotoxizität gegenüber Osteoklastenpräkursorzellen (bis 40 µg/ml). (Park, et al., 2004) In der folgenden Arbeit wurden die beiden Ellagitannine Roburin B und Vescalagin hinsichtlich dieser Inhibitionsfähigkeiten getestet.

2.1 Testsubstanzen

2.1.1 Tannine allgemein

Die Gesamtheit von biochemischem Aufbau, Abbau beziehungsweise Austausch von Stoffen eines Organismus mit seiner Umwelt wird als Metabolismus bezeichnet. Bei Produkten wie Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden die für das Leben, und Zellvermehrung essentiell sind spricht man von Primärmetaboliten. Jene Stoffe die nicht primär der Vermehrung dienen werden als Sekundärmetaboliten, im Pflanzenbereich auch als Phytamine oder als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe bezeichnet. Die wichtigsten Gruppen sekundärer Pflanzenverbindungen sind phenolische Verbindungen (Polyphenole, Stilbene, Xanthone, Tannine), isoprenoide Verbindungen (Terpene, Steroide, Carotinoide), Alkaloide (Koffein, Nikotin) und Aminosäuren wie zum Beispiel Alliin oder Canavanin.

Als allgemeine Beispiele wären noch Gummi, Harze, Mycotoxine und auch Antibiotika speziell bei Mikroorganismen zu nennen.

Die in sehr vielen Pflanzen vorhandene Gruppe der Tannine (franz. Gerbstoff) zählt ebenfalls zu den Sekundärmetaboliten. Erwähnt wurde der Begriff erstmals 1796 von Seguin in Verbindung mit der Fähigkeit der Tannine Haut in Leder umzuwandeln.

Zur Zeit sind ca. 1000 Tannine bekannt, welche aufgrund ihrer chemischen Strukturvielfalt in 4 Gruppen klassifiziert werden: Gallotannine, Ellagitannine, komplexe und kondensierte Tannine.

Tannine sind pflanzlichen Ursprungs und sind in vielen Hölzern, Rinden, Früchten und pflanzlichen Gallen anzutreffen.

2.1.2 Ellagitannine

Verglichen mit den Gallotanninen verfügen die Ellagitannine über einen komplexeren Strukturaufbau. Die Grundstruktur besteht aus **Hexahydroxydiphenoleinheiten** (so genannte HHDP Einheiten), welche durch oxidative Kupplung zweier an D-Glucose geknüpfter Galloyleinheiten gebildet werden. Als Vertreter stehen hier die 2 Epimere, Vescalagin und Castalagin, bei denen es sich um Esterverbindungen einer offenkettigen Glukose mit einer HHDP Einheit und einer 2,3,5-Nonahydroxyterphenoyleinheit handelt. Durch Substitution an der C1 Position des offenkettigen Zuckers mit Glykosiden kommt es zur Bildung von komplexeren Ellagitanninen wie zum Beispiel Roburin E.

Die Esterverbindungen der Ellagitannine werden in saurem und basischem Milieu hydrolysiert und es entsteht die wasserunlösliche Ellagsäure, von der sich letztendlich der Namen ableitet.

Die Tatsache, dass Pflanzen bei erhöhtem Schädlingsbefall vermehrt Tannine produzieren, lässt den Rückschluss zu, dass ihre biologische Funktion im Fraßschutz gegen Herbivoren liegt. (Hirono, 1987)

Heutzutage werden die Tannine nicht nur mehr in der Lederproduktion benötigt, sondern es gibt eine Vielzahl an Einsatzmöglichkeiten zur Therapie von bestimmten Erkrankungen, wie zum Beispiel Bluthochdruck, bei Schwermetallvergiftungen und auch als Radikalfänger. (Scalbert, 1991), (Scholz und Rimpler, 1989)

In einer Publikation von 2007 wird Rugosin E, einem Ellagitannin, die potente Inhibitionsfähigkeit einer menschlichen Brustkrebszellkultur MDA-MB-231 zugeschrieben. Es kam zu einer Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion über die NF κ B Signalkaskade. (Kuo, et al., 2007)

Weiters gibt es zahlreiche Artikel über Ellagitannine und ihre Fähigkeit zur Hemmung der Topoisomerase 2 und HIV Promotoren. (Uchiumi, et al., 2003)

Aufgrund dieser vielfältigen biologischen Wirkungen wird nun aktuell durch die moderne Medizin gezielt Wirkstoffforschung betrieben und es werden immer mehr Tannine isoliert, beziehungsweise charakterisiert und synthetisiert.

Hauptaufnahmequellen für Ellagitannine stellen in der westlichen Welt hauptsächlich rote Früchte, wie Brombeeren (2010 mg/kg), Himbeeren (1240 mg/kg) und Erdbeeren (405 mg/kg) dar, wobei auch in Nüssen, speziell Walnüssen (7400 mg/kg) und Haselnüssen sowie Pecanüsse (1980 mg/kg) diese Wirkstoffe enthalten sind.

Dadurch, dass bei der Wein- bzw. Whiskeyherstellung Holzfässer von *Quercus alba* verwendet werden, kann man einen relativ hohen Anteil an Ellagitanninen, wie zum Beispiel Castalagin, Vescalagin, Grandinin und Roburin E nachweisen. (Glabasnia und Hofmann, 2006)

Der durchschnittliche Ellagitanningehalt von *Quercus alba* wird in der Literatur mit 0,12 mg Roburin B/g bzw. 2,8 mg Castalagin /g Holz angegeben. (Cadahia, et al., 2001)

Die Ellagitannine beeinflussen durch ihr Löslichkeit den Geschmack von Getränken, wobei die Lagerzeit eine sehr wichtige Rolle spielt. Aufgrund der Tatsache, dass sich die Gerbstoffe vorwiegend in nicht essbaren Pflanzenteilen bilden, wurde ihnen lange Zeit wenig Beachtung geschenkt. Erst in jüngerer Zeit wird intensiv an den vielfältigen positiven biologischen Wirkungen der Ellagitannine geforscht, jedoch ist aktuell noch nicht viel über die Ellagitanningehalte in der Nahrung bekannt, genauso wenig wie Daten zur Aufnahmemenge und Bioverfügbarkeit dieser Substanzen.

Wissenschaftlich gesichert ist die antioxidative Wirkung der Ellagitannine in vitro.

(Mullen, et al., 2002)

Obwohl es bis dato keine definierten Studien zur Aufnahme und Bioverfügbarkeit von Ellagitanninen im Menschen gibt, haben in vitro Versuche und Tierstudien gezeigt, dass es zu einer Hydrolyse der HHDP Einheit kommt, jedoch weiß man nicht, ob der physiologische pH Wert hierbei eine Rolle spielt, bzw. ob auch die menschliche Darmflora daran beteiligt ist. Es besteht eventuell die Möglichkeit, dass die Darmflora die schwer lösliche Ellagsäure und die Tannine metabolisieren und dadurch die Resorption erhöhen kann.

Teel und Martin konnten Ellagsäure in einer Studie an Mäusen in Urin, Galle und Blut als Sulfat-, Glukuronid und Glutathionkonjugat nachweisen. (Teel und Martin, 1988)

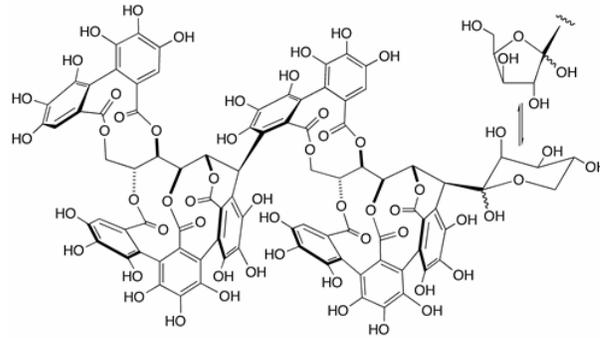
Der wichtigste Metabolit von Ellagitanninen und Ellagsäure wurde schließlich mit Urolithin B gefunden. Diese Substanz entsteht vermutlich beim Verzehr von Walnüssen durch die Metabolisierung der Kolondarmflora. (Cerde, et al., 2005)

Basierend auf den Erkenntnissen des Artikel „Furosin, an ellagitannin, suppresses RANKL-induced osteoclast differentiation and function through inhibition of MAP kinase activation and actin ring formation“ wurde in dieser Diplomarbeit mit den Testsubstanzen SASN6 (Roburin B) und SASN1 (Vescalagin) gearbeitet. (Quideau)

Beide Substanzen stammen vom chemischen und biologischen Institut der Universität Bordeaux, Frankreich. Die Extraktion dieser Ellagitannine erfolgte aus Eichenholzweinfässern von *Quercus petrae* und *Q. robur*.

2.1.3 SASN6 (=Roburin B)

Abbildung 9: Roburin B

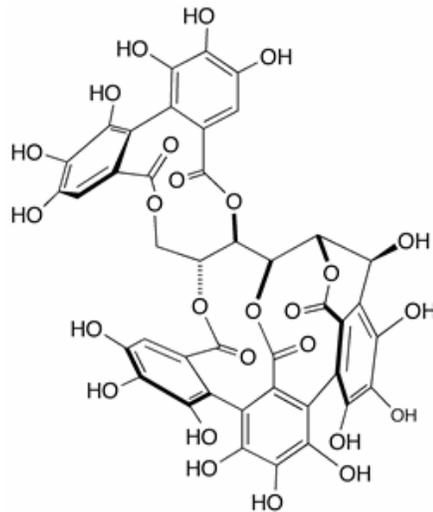


Legende zu Abbildung 9: Darstellung der Strukturformel des Ellagitannins Roburin B mit der Bezeichnung SASN6. Das Molekulargewicht der Verbindung beträgt 1850 g/Mol.

(Quelle: <http://www.sasn.u-bordeaux1.fr/SASN/products.html>)

2.1.4 SASN1 (=Vescalagin)

Abbildung 10: Vescalagin



Legende zu Abbildung 10: Strukturformel von Vescalagin ($C_{41}H_{26}O_{26}$) mit einem Molekulargewicht von 934 g/Mol. CAS Nummer: 36001-47-5 Der Vescalagingehalt in trockenem Holz liegt bei 20-65 mg/g.

(Quelle: <http://www.sasn.u-bordeaux1.fr/SASN/products.html>)

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Laborgeräte

Tabelle 3: verwendete Laborgeräte

Laborgerät	Modellbezeichnung
"ELISA Reader"	Fa. Labsystems Multiskan MS
Analysenwaage	Fa. Sartorius, MC 210 P
Chemiluminescence films	Kodak BioMax Light Film Lot 425 005 und GE Healthcare Amersham Hyperfilm ECL
Computer	Apple Powermac
Cytoperm Inkubator	Fa. Kendro HERA Cell 240
Digitalkamera	Fa. Nikon Coolpix 995
Elektrophoreseapparatur	Fa. Bio-Rad
Eppendorf-Gefäße	Fa. Eppendorf
Injektionsnadeln	Fa. Rose GmbH, Luer/NSP
Kaltlichtlampe	Fa. Schott KL 1500 electronic
Knochensäge	Fa. Buehler Isomet low speed saw
Kühlschrank -80°C	Jouan VX 490
Kulturplatten(6-well, 48-well)	Fa. Iwaki und Fa. Greiner
Magnetrührer inkl. Heizung	Ikamau RCT
Mikropipetten	Fa. Labsystems
Mikroskop	Fa. Nikon Optiphot-2-OD
Mikroskop	Fa. Olympus
pH-Meter	Fa. Inula Metrohm 713 pH Meter
Polypropylenröhrchen	Fa. Greiner
Sägeblatt	Fa. Buehler Diamond wafering blade/series 15 HC Diamond
Schüttelschrank	Fa. Edmund Bühler Swip
Spannungsgerät f. SDS-PAGE	Fa. Bio-Rad Power PAC 3000
Spannungsgerät f. Western Blot	Fa. Bio-Rad Model 1000/500 Power Supply
Sterilwerkbank "Laminar Airflow"	Fa. Ehret
Thermomixer	Fa. Eppendorf Thermomixer 5436
Trockenschrank f. Filme	Fa. Kindermann, Trockner
Vortexer	Fa. Bender & Hobein AG Vortex Genie 2
Wasserbad	Fa. Aigner GFL 1066
Zentrifuge	Fa. Eppendorf Zentrifuge 5415C
Zentrifuge	Fa. Bartelt HERMLE Z 323K
Zentrifugenröhrchen 10, 50 ml	Fa. Sterilin

3.1.2 Chemikalien, Lösungen und Medien

- Alpha-MEM (Minimal Essentielles Medium)

Herkunft	GibcoBRL
Zusammensetzung	<ul style="list-style-type: none"> • L-Aminosäuren, Vitamine, anorg. Salze • Glucose, Phenolrot, Pyruvat <p>Diese Medium eignet sich aufgrund seines guten Milieus für fast alle Säugerzellen</p>

- BSA (bovine serum albumin)

Herkunft	Sigma-Aldrich
Zusammensetzung	Lot 023K0629 Fraktion V

- „Blocking“ Puffer

BSA	2,00 g	
NaN ₃	200 µl	
TBST 0,1 % ad	50,00 ml	

Der Blocking Puffer kann maximal 3x verwendet werden.

- ECL Detektions Lösung

Herkunft	Amersham Pharmacia Biotech
Zusammensetzung	<ul style="list-style-type: none"> • Detektion zweier Reagenzien im Mischungsverhältnis 1:1 • Nr. RPN2106

Man verwendet etwa eine Minute 0,125 ml Reagens pro cm² Nitrozellulose für die anschließende Detektion.

- Entwicklungslösung für Film

Herkunft	ADEFO Chemie
Zusammensetzung	Adefofix Mix Fixierkonzentrat

- Filterpapier für Western Blot

Herkunft	Schleicher&Schuell
Zusammensetzung	Gel-Blotting Papier No. 426690

- Fixierlösung für Film

Herkunft	ADEFO Chemie
Zusammensetzung	Adefofit 90

- „Lower“ TRIS, pH= 8,8

Tris Base	18,7 g	193 mM
10% SDS Lösung	4,00 ml	
mit H ₂ O dest. ad	100 ml	

Tris Base wird in 70ml destilliertem Wasser gelöst, auf pH=8,8 eingestellt. Danach wird die SDS Lösung hinzugefügt und auf 100ml aufgefüllt.

- Lysis Buffer

Frackelton Puffer	1,5 ml	
NaF	75 µl	
Aprotinin	7,5 µl	
Leupeptin	15 µl	
o-Vanadate	15 µl	
Pepstatin	1,5 µl	
PMSF	15 µl	

- Molekulargewicht, Standard

Herkunft	Invitrogen
Zusammensetzung	<ul style="list-style-type: none"> • No. LC5925 SeeBlue Plus2 Prestained • Lot# 1313648

- Natriumazid Lösung (500x)

NaN ₃	0,10 g	
mit H ₂ O dest. ad	1,00 ml	

- Nitrozellulosemembran

Herkunft	Schleicher und Schuell
Zusammensetzung	<ul style="list-style-type: none"> • Protran BA 85 Nitrocellulose 0,45 µm • Lot# FB0348-1

- PBS (**p**hosphate **b**uffered saline **s**olution)

KCl	2,00 g	27 mM
KH ₂ PO ₄	2,00 g	14 mM
NaCl	80,00 g	1379 mM
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	27,00 g	152 mM
mit H ₂ O dest. ad	1000 ml	

Anschließend wird diese Lösung 1:10 verdünnt und steril filtriert.

- Ponceau Färbelösung (0,2%)

Ponceau	0,20 g	
Trichloressigsäure	3,00 g	
mit H ₂ O dest. ad	100 ml	

- „Running“ Puffer (10x), pH=8,9

Glycin	286,50 g	3114 mM
Tris Base	60,50 g	643 mM
SDS	40,00 g	138 mM
mit H ₂ O dest. ad	2000 ml	

Vor Gebrauch wird der Puffer 1:10 verdünnt.

- „Running“ Gel (10% Acrylamid)

H ₂ O	1,43 ml	
Lower Tris	880 µl	
Acrylamid	1,17 ml	
TEMED	1,05 µl	
APS 10 %	17,50 µl	

- „Sample“ Puffer (4x)

Tris Base	1,52 g	16 mM
Glycerin	9,45 g	102 mM
SDS	6,00 g	20 mM
Bromphenolblau	0,20 g	0,3 mM
EDTA	0,116 g	0,5 mM
mit H ₂ O dest. ad	50 ml	

Tris Base, Glycerin und EDTA zuerst in Wasser gelöst, auf pH= 6,9 einstellen und dann SDS und Bromphenolblau dazugeben. Anschließend auf 50 ml auffüllen.

- „Stacking“ Gel

H ₂ O	945,00 µl	
Upper Tris	375,00 µl	
Acrylamid	195,00 µl	
TEMED	2,40 µl	
APS 10 %	15,00 µl	

- „Stripping“ Puffer

Tris HCl	0,931 g	62,5 mM
SDS Lösung 2 %	2,00 g	
β-MercaptoEtOH	700,00 µl	100 mM

mit H ₂ O dest. ad	100 ml	
-------------------------------	--------	--

Zuerst wird Tris HCl in Wasser gelöst, der pH auf 6,8 eingestellt und danach die SDS Lösung hinzugegeben. β -Mercaptoethanol wird erst kurz vor Gebrauch dazugegeben.

- TBS (Tris Buffered Saline Solution), 10x

Tris Base	24,20 g	257 mM
NaCl	80,00 g	1379 mM
HCl	38,00 ml	1055 mM
mit H ₂ O dest. ad	2000 ml	

Die Lösung wird auf pH=7,6 eingestellt und vor Gebrauch auf 1:10 verdünnt.

- TBST (Tris Buffered Saline Solution Tween-20)

	Tween 20	TBS
TBST 0,1 %	5,00 ml	4995 ml
TBST 0,3 %	15,00 ml	4985 ml

- Toluidinblau Färbelösung

Natriumborat	1,00 g	
Toluidinblau	1,00 g	
mit H ₂ O dest. ad	100 ml	

- “Transfer” Puffer

Glycin	18,00 g	390 mM
Tris Base	3,765 g	80 mM
Methanol	500,00 ml	
mit H ₂ O dest. ad	2000 ml	

Die Lösung wird auf pH=8,3-8,4 eingestellt.

- Tween 20

Herkunft	Sigma
Zusammensetzung	Polyoxyethylensorbitan-monolaurat <ul style="list-style-type: none"> • Lot# 88H0469

- “Upper” TRIS, pH= 6,8

Tris Base	6,06 g	63 mM
SDS Lösung 10%	4,00 ml	
mit H ₂ O dest. ad	100 ml	

Tris Base wird in 70 ml Wasser gelöst, auf pH=6,8 eingestellt und nach Zugabe der 10 % SDS Lösung mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

3.1.3 Antikörper

Folgende Antikörper wurden zur Detektion eingesetzt:

Phospho p-38 MAP Kinase, 43 kDa

Herkunft	<ul style="list-style-type: none"> • Cell Signaling # 9211 • Polyklonaler Antikörper vom Kaninchen • Hochspezifisch auf phosphorylierte Threonin 180 und Tyrosin 182 der Proteine p38 MAP Kinase
Zusammensetzung	200 µl Ak-Lösung (10 mM Na-HEPES (pH=7,5), 150 mM NaCl, 100 µg/ml BSA, 50% Glycerin)
Verdünnung für Western Blot	1:1000 in einer Lösung aus 0,2 g BSA in 4 ml 0,1% TBST und 8 µl NaN ₃ -Lösung (10%) zur Konservierung

Tabelle 4: phospho p-38 MAP Kinase

Phospho AKT, 60 kDa

Herkunft	<ul style="list-style-type: none"> • Cell Signaling # 4060 • Monoklonaler Antikörper vom Kaninchen • Hochspezifisch auf phosphorylierte Serin 473 der Proteine phospho-Akt
Zusammensetzung	200 µl Ak-Lösung (10 mM Na-HEPES (pH=7,5), 150 mM NaCl, 100 µg/ml BSA, 50% Glycerin)
Verdünnung für Western Blot	1:1000 in einer Lösung aus 0,2 g BSA in 4 ml 0,1% TBST und 8 µl NaN ₃ -Lösung (10%) zur Konservierung

Tabelle 5: phospho AKT

Anti Beta Aktin, 45 kDa

Herkunft	<ul style="list-style-type: none"> • Cell Signaling # 4970 • Monoklonaler Antikörper vom Kaninchen • Hochspezifisch auf endogenes beta Aktin Protein
Zusammensetzung	200 µl Ak-Lösung (10 mM Na-HEPES (pH=7,5), 150 mM NaCl, 100 µg/ml BSA, 50% Glycerin)
Verdünnung für Western Blot	1:1000 in einer Lösung aus 0,2 g BSA in 4 ml 0,1% TBST und 8 µl NaN ₃ -Lösung (10%) zur Konservierung

Tabelle 6: Anti Beta Aktin

AKT, 60 kDa

Herkunft	<ul style="list-style-type: none"> • Cell Signaling # 2967 • Monoklonaler Antikörper von Maus • Hochspezifisch auf endogenes Akt1 Protein und auch der phosphorylierten Form
Zusammensetzung	200 µl Ak-Lösung (10 mM Na-HEPES (pH=7,5), 150 mM NaCl, 100 µg/ml BSA, 50% Glycerin)
Verdünnung für Western Blot	1:1000 in einer Lösung aus 0,2 g BSA in 4 ml 0,1% TBST und 8 µl NaN ₃ -Lösung (10%) zur Konservierung

Tabelle 7: AKT

Phospho NF-κB, 75 kDa

Herkunft	<ul style="list-style-type: none"> • Cell Signaling #3033 • Monoklonaler Antikörper von Hase
Zusammensetzung	100 µl Ak-Lösung (10 mM Na-HEPES (pH=7,5), 150 mM NaCl, 100 µg/ml BSA, 50% Glycerin)
Verdünnung für Western Blot	1:1000 in einer Lösung aus 0,2 g BSA in 4 ml 0,1%

	TBST und 8 µl NaN ₃ -Lösung (10%) zur Konservierung
--	--

Tabelle 8: phospho NF- κ B

Phospho MAP Kinase P42/P44, 44kDa

Herkunft	<ul style="list-style-type: none"> • Cell Signaling # 9101S • Polyklonaler Antikörper vom Kaninchen • Hochspezifisch auf phosphorylierte Threonin 202 und Tyrosin 204 der Proteine p44 und p42 MAP Kinase (ERK1 und ERK2)
Zusammensetzung	200 µl Ak-Lösung (10 mM Na-HEPES (pH=7,5), 150 mM NaCl, 100 µg/ml BSA, 50% Glycerin)
Verdünnung für Western Blot	1:1000 in einer Lösung aus 0,2g BSA in 4ml 0,1% TBST und 8µl NaN ₃ -Lösung (10%) zur Konservierung

Tabelle 9: phospho MAP Kinase P42/P44

p-38 MAP Kinase, 43 kDa

Herkunft	<ul style="list-style-type: none"> • Cell Signaling # 9212 • Polyklonaler Antikörper vom Kaninchen • Hochspezifisch auf endogenes p38α, -β, -γ MAP Kinase Protein
Zusammensetzung	200 µl Ak-Lösung (10 mM Na-HEPES (pH=7,5), 150 mM NaCl, 100 µg/ml BSA, 50% Glycerin)
Verdünnung für Western Blot	1:1000 in einer Lösung aus 0,2 g BSA in 4 ml 0,1% TBST und 8 µl NaN ₃ -Lösung (10%) zur Konservierung

Tabelle 10: p-38 MAP Kinase

Phospho-Src, 60 kDa

Herkunft	<ul style="list-style-type: none"> • Cell Signaling # 2105 • Polyklonaler Antikörper vom Kaninchen • Hochspezifisch auf phosphorylierte Tyrosin 527 der Proteine phospho-Src
Zusammensetzung	200 µl Ak-Lösung (10 mM Na-HEPES pH=7,5, 150 mM NaCl, 100 µg/ml BSA, 50% Glycerin)
Verdünnung für Western Blot	1:1000 in einer Lösung aus 0,2 g BSA in 4 ml 0,1% TBST und 8 µl NaN ₃ -Lösung (10%) zur Konservierung

Tabelle 11: phospho-Src

Phospho-AKT, 60 kDa

Herkunft	<ul style="list-style-type: none"> • Cell Signaling # 4060 • Monoklonaler Antikörper vom Kaninchen • Hochspezifisch auf phosphorylierte Serin 473 der Proteine phospho-Akt
Zusammensetzung	200 µl Ak-Lösung (10 mM Na-HEPES pH=7,5, 150 mM NaCl, 100 µg/ml BSA, 50% Glycerin)
Verdünnung für Western Blot	1:1000 in einer Lösung aus 0,2 g BSA in 4 ml 0,1% TBST und 8 µl NaN ₃ -Lösung (10%) zur Konservierung

Tabelle 12: phospho AKT

Anti-Rabbit IgG HRP Konjugat

Herkunft	<ul style="list-style-type: none"> • Promega (Kat. Nr. W4011) • Immunglobulin (schwere/leichte Ketten) aus Ziegen Serum, das mit einer Peroxidase konjugiert wurde • Dieser Antikörper reagiert mit schweren Ketten von Kaninchen IgG
----------	--

Zusammensetzung	300 µl Ak-Lösung (1mg/ml) (0,1 M Na ₃ PO ₄ (pH=7,6), 0,25 M NaCl, BSA als Stabilisator und 0,01% Thiomersal)
Verdünnung für Western Blot	Verdünnung 1: 20000 in einer Lösung aus 0,1g BSA in 4 ml 0,1% TBST

Tabelle 13: Anti-Rabbit IgG HRP Konjugat

Anti-Mouse IgG HRP Konjugat

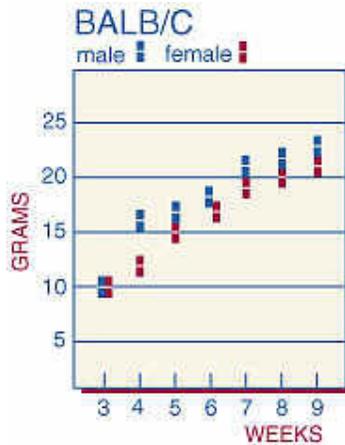
Herkunft	<ul style="list-style-type: none"> • Promega (Kat. Nr. W4031) • Immunglobulin (schwere/leichte Ketten) aus Ziegenserum, das mit einer Peroxidase konjugiert wurde • Dieser Antikörper reagiert mit allen Maus Immunglobulinen der Klasse IgG und den leichteren Ketten anderer Klassen
Zusammensetzung	300 µl Ak-Lösung (1mg/ml) (0,1 M Na ₃ PO ₄ (pH=7,6), 0,25 M NaCl, BSA als Stabilisator und 0,01% Thiomersal)
Verdünnung für Western Blot	Verdünnung 1: 20000 in einer Lösung aus 0,1g BSA in 4 ml 0,1% TBST

Tabelle 14: Anti-Mouse IgG HRP Konjugat

3.1.4 Mäuse

Bei den in den Experimenten verwendeten Tieren handelte es sich um Balb/c Mäuse weiblichen Geschlechts zwischen 4 und 8 Wochen.

Abbildung 11: Balb/c



Legende zu Abbildung 11:

Zusammenhang zwischen Körpergewicht und Alter von männlichen und weiblichen Balb/c Mäusen.

1923 wurde von Mc Dowell die erste Balb/c Maus verwendet. Es handelt sich um einen sehr weit verbreiteten Stamm, welcher in vielen Wissenschaftsbereichen zur Anwendung kommt, speziell zur Produktion von monoklonalen Antikörpern. Balb/c Mäuse gehen aus einer >20 Generationen Bruder/Schwester Inzuchtpaarung hervor. Sie sind Albinos und von kleiner Größe.

Balb/c charakteristische Stammmerkmale:

- Niedrige Alkoholpräferenz
- Niedrige Inzidenz von Mammakarzinomen
- Resistent gegen Artherosklerotische Veränderungen
- Hohe Inzidenz für Herzverkalkung, spez. Männchen
- Insgesamt höhere Inzidenz von Herzfehlern und spontanen myokardialen Läsionen des rechten Ventrikels
- Generell gute Zuchtleistung
- Empfindlich gegenüber Strahlung
- Geringe Inzidenz von Eierstockzysten
- Verlust des Hörsinns meist vor dem 1. Lebensjahr
- Durchschnittliche Wurfgröße von 5-7 Welpen und Entwöhnung nach 19 Tagen

3.1.5 Zellen

a) Osteoblasten:

Verwendet wurden selbstisolierte, in flüssigem Stickstoff gelagerte Osteoblasten Chargen.

b) Knochenmarkzellen von den Hinterläufen von Balb/c Mäusen.

c) RAW 264.7 Zellen:

Hierbei handelt es sich um eine makrophagenähnliche, durch Abelson Leukämie Virus transformierte Zelllinie murinen Ursprungs. Diese Zelllinie entwickelt sich

unter Einfluss von RANKL binnen weniger Tage zu multinukleären Osteoklasten. (Collin-Osdoby, et al., 2003)

Da diese Zellen extrem sensibel auf Lipopolysaccharide (Endotoxine Gram-negativer Bakterien) reagieren müssen alle Lösungen und Materialien steril und endotoxinfrei sein.

d) NIH Zellen:

NIH-3T3 Zellen stellen eine permanente Mäusefibroblastenzelllinie dar.

Sie wurden 1962 von Torado und Green etabliert.

3.2 Methoden

3.2.1 Osteoblasten-Osteoklasten Cokultur, Pitassay

Der Pitassay dient zur Untersuchung, ob und in welchem Ausmaß eine bestimmte Substanz die Knochenresorption der murinen Osteoklasten beeinflusst.

Begonnen wird mit der Inkubation von Osteoblasten, welche zu je 4 Mio./Vial in flüssigem Stickstoff eingefroren sind, abhängig von der Experimentgröße.

Um die richtige Zellzahl /cm² zu erhalten werden 4 Mio. OB in 24 ml Nährmedium hi.(hitzeinaktiviert) /cm² suspendiert.

Als Differenzierungsfaktoren wurden Vit. D₃ (1x10⁻⁹ Mol) und Prostaglandin E₂ (1x10⁻⁶ Mol) unter der Berücksichtigung von 500 µl Volumen/Well zugegeben. Dies führt dazu, daß die OB RANKL bilden. RANKL bewirkt dann die Differenzierung der Knochenmarkzellen (die anschließend dazugegeben werden) in Osteoklasten.

Ablauf eines solchen Pitassays:

Tag 0: Zugabe der Knochenmarkszellen

Tag 2 und 4: Substanzzugabe und Medientausch

Tag 5: Ende der Kultur und Toluidinblaufärbung

3.2.2 Vorbereitung der Knochenplättchen

Für die im Pitassay verwendeten Knochenplättchen wurden kühl gelagerte Rinderröhrenknochen verwendet, welche mit einer Spezialknochensäge 300-400 µm dick geschnitten wurden.

Die Knochenscheibchen wurden mit Wasser befeuchtet und mit einem Messer in quadratische Form (4x4 mm) gebracht. 4 dieser Quadrate sollten die Fläche eines Wells einer 48-well-Platte haben.

3.2.3 Reinigung und Vorinkubation

Arbeitsschritte für Knochenplättchenreinigung:

- 3x 5 min in Wasser (Ultraschallbad)
- 1x 5 min in EtOH 70% (Ultraschallbad)

Zu diesem Zeitpunkt ist die Aufbewahrung der Plättchen in EtOH 96% möglich.

- Zur Desinfektion Ober- und Unterseite 15 min UV bestrahlen
- Die Plättchen werden unter dem Laminar Airflow mit Silikon in die Well

Platten eingeklebt und mit Nährmedium im Inkubator für 2-3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ Sättigung vorinkubiert.

3.2.4 Osteoblasten Aussaat

4 Mio. Osteoblasten werden in 24 ml Nährmedium (hitzeinaktiviert(hi)) suspendiert und gut durchgemischt 500 µl in jedes Well pipettiert.

Die Well Platte wird über Nacht inkubiert und am nächsten Tag erfolgt die Zugabe der extrahierten Knochenmarkvorläuferzellen von Mäusehinterläufen.

3.2.5 Knochenmarkextraktion

Die Knochenmarkzellen wurden unter sterilen Bedingungen unter dem Laminar Airflow mittels Injektionsspritze und Medium for bonemarrow ausgespült. Anschließend zentrifugiert man die eisgekühlte Zellsuspension 5 min bei 4°C und 1500 rpm. Der Überstand wird abgesaugt und das übrig gebliebene Pellet in frischem Medium resuspendiert.

Diese Zellsuspension wurde wieder, je 500 µl, in jedes Well pipettiert und inkubiert.

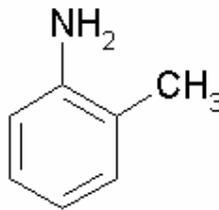
3.2.6 Toluidinblaufärbung

Synonyme: Toluidin Blue O Salt, Basic Blue 17

CAS-Nr.: 6586-04-5

Gehört in die Gruppe der Thiazinfarbstoffe

Abbildung 12: Toluidinblau



Toluidinblau dient am Tag 5 zum Färben der Pits, wobei jeweils 4 min mit 700 µl gefärbt und anschließend mit Wasser gewaschen wurde. Mit der Toluidinfärbung ist dann der experimentelle, praktische Teil des Pitassays erledigt. Die weiteren Schritte sind Digitalisierung und statistische Auswertung.

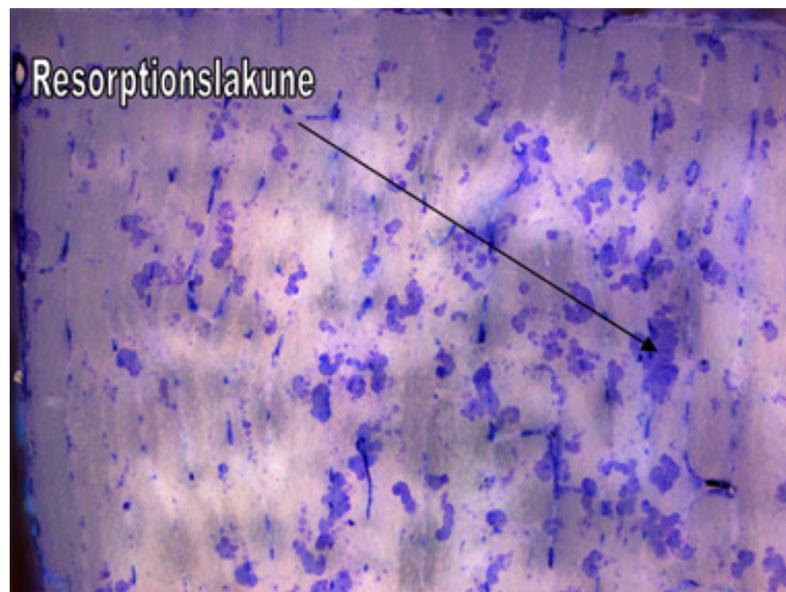
3.2.7 Cell^F, Statview, Prism

ad Cell[^]F:

Unter dem Mikroskop wurden je 2 Fotos, welche sich überschneiden, pro Knochenplättchen gemacht und mit dem Programm Cell[^]F zusammengefügt, bzw. so übereinandergelegt, dass die komplette Knochenfläche sichtbar wird. Mithilfe dieser umfangreichen Software wurden nun automatisiert die Flächen der Resorptionslakunen gezählt und vermessen.

Beispiel eines solchen Knochenplättchens:

Abbildung 13: Beispiel einer „Osteoklastenfrassspur“



Legende zu Abbildung 13: Darstellung der dunklen Resorptionslakunen eines mit Toluidinblau gefärbten Knochenplättchens. Hierbei handelte es sich um die Kontrollgruppe einer 5 tägigen murinen Osteoblasten Osteoklasten Kokultur.

ad Statview[®]:

Mithilfe von Excel[®] wurden die Rohdaten tabellarisch zusammengefasst, um die prozentuellen Resorptionsflächen der einzelnen Knochenplättchen zu erhalten.

Diese Listen wurden in das Statistikprogramm Statview[®] II der Fa. SAS. importiert und mithilfe des Fisher PLSD-Test in den Konfidenzintervallen 95%, 99% und 99,9% untersucht. Der zugrunde liegende Algorithmus basierte auf ANOVA (analysis of variance).

ad Prism[®]:

Für die graphische Darstellung der statistischen Darstellung wurde Prism[®] (Ver. 5) von Graphpad Software herangezogen.

3.2.8 Osteoklastenherstellung aus RAW264.7 bzw. NIH3T3 Zelllinie

Ausgesäat wurden in den diversen Versuchen murine RAW264.7 Zellen bzw. auch NIH3T3 Zellen in speziellen 6er Wellplatten für Gewebekultur. RANKL fungierte als Initiator der Osteoklastendifferenzierung und Resorptionsaktivität in RAW 264.7 Zellen, wohingegen bei NIH3T3 Zellen PDGF in einer Konzentration von 10 ng/ml sich als geeignet erwies.

Aus der Präosteoklastenzelllinie entwickelten sich multinukleare Osteoklasten.

(Collin-Osdoby et al., 2003).

Die RANKL-Konzentration betrug 50 ng/ml, was bei einem Well Volumen von 1,5 ml 7,5 µl RANKL entsprach.

Pipettiert wurden 1,5 ml murine RAW264.7 Zellsuspension/Well. Nach 3 Tagen erfolgte dann ein Medientausch wobei ein spezielles Medium mit Alpha-MEM Glutamax, FCS_{hi} (10%) und P/S (1%) benutzt wurde.

Am 4. bzw. 5. Tag, abhängig davon, wie groß die gebildeten Osteoklasten schon waren konnte SASN6 bzw. SASN1 zugegeben und lysiert werden.

Als Stammlösung wurde eine Konzentration von 1×10^{-4} M hergestellt und daraus auf benötigte 1×10^{-5} M mit Kulturmedium verdünnt.

Tabelle 15: Schema der Inhibitionszeiten (4x 6er Wellplatten)

Mit rmRANKL**Platte 1**

Kontrolle (nur Medium,5 min)	SASN __ 1 min __ (Zeit)	SASN __ 5 min __ (Zeit)
Kontrolle (nur Medium,5 min)	SASN __ 1 min __ (Zeit)	SASN __ 5 min __ (Zeit)

Mit rmRANKL**Platte 2**

SASN __ 15 min __ (Zeit)	SASN __ 1 h __ (Zeit)	SASN __ 2 h __ (Zeit)
SASN __ 15 min __ (Zeit)	SASN __ 1 h __ (Zeit)	SASN __ 2 h __ (Zeit)

Ohne rmRANKL**Platte 3**

Kontrolle (nur Medium,5 min)	SASN __ 1 min __ (Zeit)	SASN __ 5 min __ (Zeit)
Kontrolle (nur Medium,5 min)	SASN __ 1 min __ (Zeit)	SASN __ 5 min __ (Zeit)

Ohne rmRANKL**Platte 4**

SASN __ 15 min __ (Zeit)	SASN __ 1 h __ (Zeit)	SASN __ 2 h __ (Zeit)
SASN __ 15 min __ (Zeit)	SASN __ 1 h __ (Zeit)	SASN __ 2 h __ (Zeit)

Zwischen den Substanzzugaben befanden sich die Platten im Inkubator. Die Versuchsanordnung wurde nun wie folgt in 12 verschiedene Gruppen unterteilt:

Gruppe	Inhibitionsdauer
1 (rmRANKL behandelt)	Kontrollgruppe (nur Medium) für 5 Minuten
2 (rmRANKL behandelt)	SASN für 1 Minute
3 (rmRANKL behandelt)	SASN für 5 Minuten
4 (rmRANKL behandelt)	SASN für 15 Minuten
5 (rmRANKL behandelt)	SASN für 1 Stunde
6 (rmRANKL behandelt)	SASN für 2 Stunden
7 (rmRANKL unbehandelt)	Kontrollgruppe (nur Medium) für 5 Minuten
8 (rmRANKL unbehandelt)	SASN für 1 Minute
9 (rmRANKL unbehandelt)	SASN für 5 Minuten
10 (rmRANKL unbehandelt)	SASN für 15 Minuten
11 (rmRANKL unbehandelt)	SASN für 1 Stunde
12 (rmRANKL unbehandelt)	SASN für 2 Stunden

Nach der Zellyse (3.2.9) folgte mit Hilfe des DC Proteinassay[®] BioRad (3.2.10) die Berechnung der Proteingehalte der einzelnen Samples.

Beschrieben im Kapitel Methoden, erfolgte nun die Proteinauftrennung durch SDS-PAGE (3.2.11) und anschließend der Proteintransfer mittels Western Blot (3.2.12).

3.2.9 Zellyse

Unmittelbar nach der Substanzzugabe wurden die Zellen wie folgt lysiert:

Es wurden immer 2 Wells mit gleichem Inhalt in eine Gruppe zusammengefasst um die Proteinausbeute zu erhöhen.

Vorbereitet wurden sterile Cellscaper[®], Racks auf Eis, Eppendorf[®] Gefäße und kaltes PBS-ECL.

Die Well Platten wurden mit PBS-ECL 3x abgespült und darauf jede Experimentgruppe mit 100 µl Lysisbuffer („Frackleton Buffer“ bzw. „Hot Lysis Buffer“) versehen. Die so gesammelten Zelllysate werden in der vorgekühlten (4 °C) Zentrifuge bei 15000 rpm 15 min abzentrifugiert. Anschließend wird der Überstand in beschriftete SafeLock Eppendorfs[®] gegeben. Zu diesem Zeitpunkt ist nun das Einfrieren bei -80 °C möglich.

Es stellte sich heraus, dass die Wahl des Lysisbuffer eine nicht unerhebliche Rolle bei der späteren Immunodetektion spielt.

3.2.10 Proteinassay

Zur Bestimmung des Proteingehalts der einzelnen Zelllysate wurde der DC Proteinassay[®] der Firma BioRad auf einer 96-er Well Platte durchgeführt. Diese Form der Quantifizierung basiert auf der Proteinbestimmung nach Lowry, welche als eine der empfindlichsten gilt, mit einer Sensitivität im µg/ml Bereich.

Im ersten Schritt kommt es zu einer Biuret Reaktion, genauer zu einer blauvioletten Komplexbildung zwischen Peptidbindungen und Kupfer(II) Ionen in alkalischer Lösung. Der zweite Schritt reduziert nun das gelbliche Folin-Ciocalteau Reagens. Daraus resultiert eine Blaufärbung, die auf Basis des Lambert-Beerschen Gesetz quantitativ im ELISA Reader (Photometer bzw. Mikrotiterplattenlesegerät) bei 690 nm vermessen wird.

Da der lineare Bereich beim Lambert Beer'schen Gesetz nur zwischen 0,1 und 0,9 liegt, d.h. in diesem Bereich ist die Absorption proportional zur Menge, musste je nach Proteingehalt der Proben verdünnt werden.

Gearbeitet wurde nach folgendem Pipettierschema:

- Sample (5 µl) + Reagens A' (25 µl) + Reagens B (200 µl)

Nach dem Pipettieren wurde die Well Platte kurz geschüttelt, und 15 min stehen gelassen. Ab diesem Zeitpunkt ist der DC ProteinAssay[®] etwa eine Stunde messstabil.

Tabelle 16 zeigt das Beispiel einer Berechnung des konstanten Proteingehalts für die Gelelektrophorese:

Tabelle 16: Ermittlung der Proteinkonzentration für die Gelelektrophorese mittels Proteinassay und ELISA Reader

		Protein konzentration	µg/µl total	Volumen für 30 µg	Volumen für 4xSB	Volumen für 1xSB
Gruppe	1	0,267	1,602	18,727	6,242	1,031
	2	0,276	1,656	18,116	6,039	1,845
	3	0,274	1,644	18,248	6,083	1,669
	4	0,259	1,554	19,305	6,435	0,260
	5	0,268	1,608	18,657	6,219	1,124
	6	0,275	1,65	18,182	6,061	1,758
	7	0,413	2,478	12,107	4,036	9,858
	8	0,432	2,592	11,574	3,858	10,568
	9	0,456	2,736	10,965	3,655	11,380
	10	0,425	2,55	11,765	3,922	10,314
	11	0,42	2,52	11,905	3,968	10,127
	12	0,447	2,682	11,186	3,729	11,086

Verdünnung 1 zu 6

3.2.11 Gelelektrophorese

SDS-PAGE (abgekürzt **S**odium **d**odecyl **s**ulfate **P**oly**a**crylamid**g**ele**l**ectrophorese) dient als Standardmethode zur Auftrennung von komplexen Proteingemischen.

Bei SDS handelt es sich um ein anionisches Detergenz welches die Eigenladung der Proteine überdeckt und sie in Mizellen mit konstanter Eigenladung umwandelt. Pro g Protein werden 1,4 g SDS benötigt.

Je nach verwendeten Kamm wird auf 20-30 µg Protein/Slot berechnet.

Vor der Gelbeladung werden die Samples 5 min auf 95 °C erhitzt um die Sekundär und Tertiärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrückenbindungen und Molekülstreckung zu zerstören. Disulfidbrückenbindungen z.b.: zwischen Cysteinen können durch Thiolverbindungen wie Beta-Mercaptoethanol oder **D**ithio**t**hreitil (DTT) aufgespalten werden. Auf diese Art und Weise wirkt nur noch die Proteingröße (molare Masse) als Trennkriterium.

Die Elektrophorese erfolgt in einem diskontinuierlichen Tris/HCl/Tris-Glycin Puffersystem. Ein weitporiges Sammelgel (Tris-Glycin-Puffer pH:6,8 3-4% Acrylamid) überschichtet ein engmaschiges Trenngel(Tris-Glycin Puffer pH:8,8 5-20% Acrylamid).

Der pH Wert des Sammelgels liegt nahe am isoelektrischen Punkt des Glycin, deshalb hat dieses am Anfang der Trennung eine sehr niedrige elektrophoretische Mobilität (Folgeion).

Chloridionen dagegen haben eine sehr hohe Mobilität (Leitton).

Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes kommt es zu einer Vortrennung und Aufkonzentrierung der einzelnen Proteinklassen am Start. Beim Auftreffen auf das Trenngel erfahren die Proteine einen hohen Reibungswiderstand, welcher zu „Stau“ und Zonenverschärfung führt. Anders als im Stacking Gel wirkt im Trenngel überall die gleiche Feldstärke und für die Wanderstrecke ist nur noch die Molekülgröße verantwortlich.

Trägermatrix:

Das Gel besteht aus Acrylamid, Bisacrylamid, TEMED, Wasser und APS.

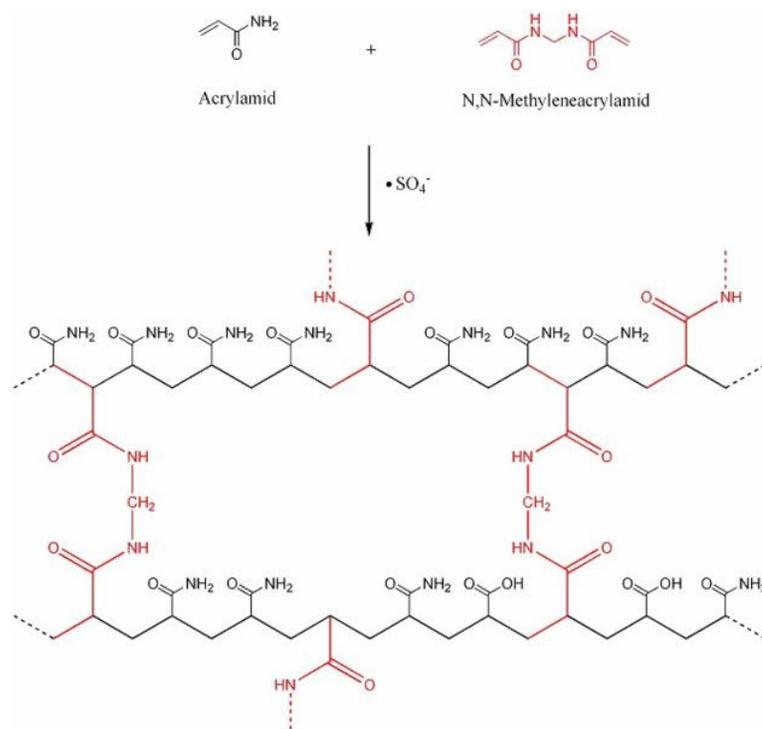
Aufgrund der Neurotoxizität von Acrylamid, sollte, bevor es zu Polyacrylamid umgewandelt wird, entsprechend vorsichtig gearbeitet werden.

Das klare durchsichtige Polyacrylamidgel ist sehr stabil und chemisch inert.

Als Polymerisationsstarter dient APS (Ammoniumpersulfat $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$). APS bildet im Wasser freie Radikale die mit Acrylamid reagieren. Das so entstandene Acrylamidradikal kann nun mit anderen Acrylamidmono bzw. Polymeren weiterreagieren.

TEMED (N,N,N,N,-Tetramethylethylendiamin) dient als Katalysator der Polymerisation, indem es die Radikalbildung des APS erleichtert und dabei selbst ein stabileres Radikal darstellt.

Abbildung 14: Polymerisationsreaktion



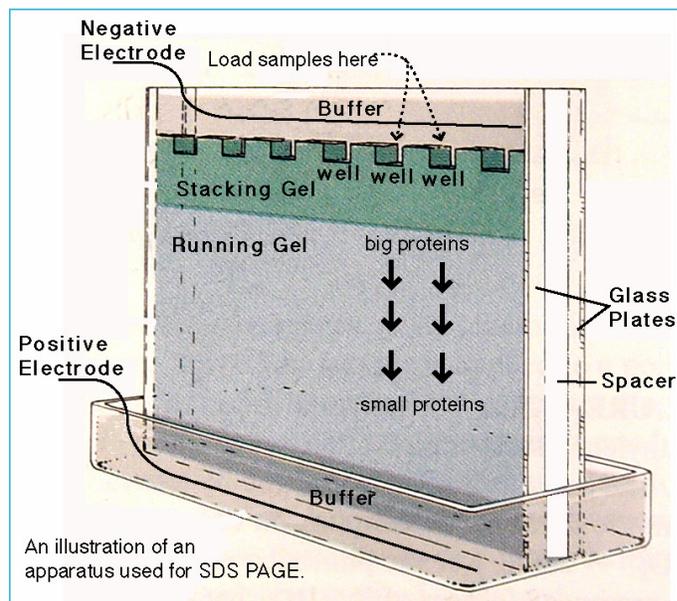
Je länger das Trenngel, desto besser die Auftrennung und je dünner das Gel, desto schärfer sind die Banden.

Molekulargewicht:

Um die Größe der Proteine zu bestimmen wird pro Blot ein standardisierter Marker mit bekannter molarer Masse aufgetrennt.

Die relative Mobilität der Proteine ist linear zu dem Logarithmus der molaren Masse.

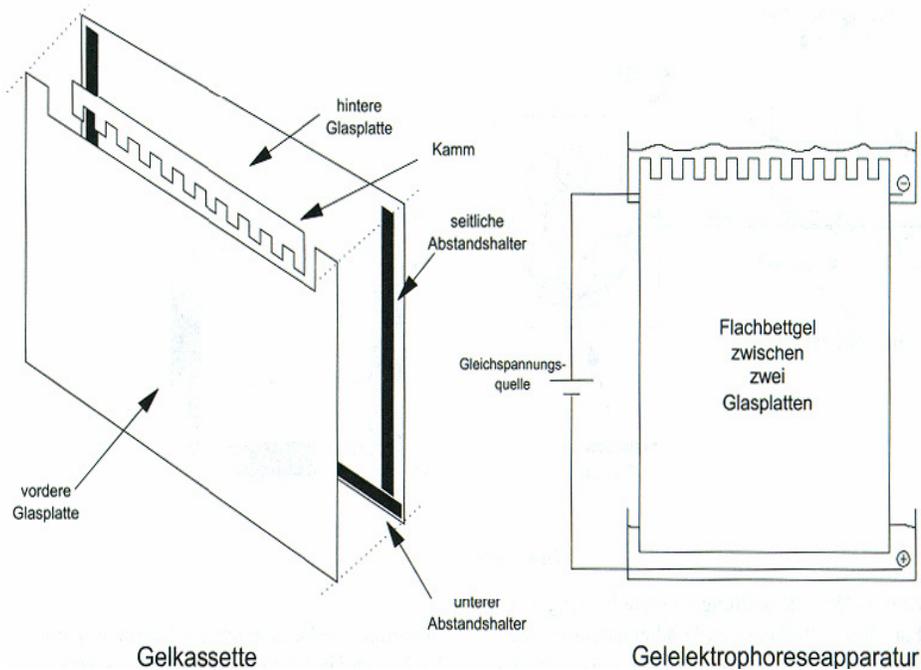
Abbildung 15: Gelelektrophoresekammer



Legende zu Abbildung 15: Schematischer Aufbau einer Gelelektrophoresekammer.

(Quelle:http://web.chemistry.gatch.edu/~williams/bCourse_Information/4581/techniques/gel_elect/page_protein.html)

Abbildung 16: Gelgießständer



Legende zu Abbildung 16: Abbildung einer Gelkassette und Aufbau der Gelelektrophoreseapparatur

Praktische Durchführung:

Gießen des Trenngels:

Gearbeitet wird mit puderlosen Handschuhen, um Kontamination durch fremde Proteine zu vermeiden. Glasplatten und Spacer werden in den Gelgießständer eingespannt. Dichtheit der Apparatur wird mit Wasser überprüft. Danach wird das Running Gel vorbereitet. APS kommt als Polymerisationsstarter als Letztes dazu. Vorsichtig wird das Gel gegossen und anschließend mit Wasser MilliQ überschichtet um eine Austrocknung zu vermeiden. Die Polymerisationszeit von Acrylamidgelen beträgt zw. 30 und 60 Minuten. In dieser Arbeit wurde jedoch das Running gel immer am Vortag hergestellt, um eine so genannte Nachpolymerisation durch genauere Porengröße zu erreichen. Ergebnis sind besser reproduzierbare Ergebnisse.

Gießen des Sammelgels:

Das Wasser auf dem Running Gel wird mit Filterpapier abgesaugt und anschließend wird der Gelgießständer mit dem Stacking Gel befüllt. Bevor die Polymerisation stattfindet wird je nach benötigter Slotzahl ein geeigneter Kamm in das Gel gesteckt. Das Stacking Gel wird 60 Minuten stehen gelassen.

Anschließend wird der Kamm entfernt und die Slots mit 1x Running Buffer gewaschen.

Das Gel wird nun in die Elektrophoresekammer eingehängt und mit 1x Running Buffer aufgefüllt.

Probenaufbereitung:

Die Samples werden auf Eis gekühlt, mit der korrekten Menge an 4xSB und 1xSB versehen und dann 5 min bei 95°C erhitzt. Danach wird kurz zentrifugiert.

Probenauftragung und Elektrophorese:

Je nach verwendetem Kamm wird die Probe mittels speziellen „Gel Loading Tips“ sorgfältig und langsam in die Slots pipettiert.

Die Stromversorgung und Verbindung mit dem Spannungsgerät geschieht über den Deckel der Elektrophoreseapparatur.

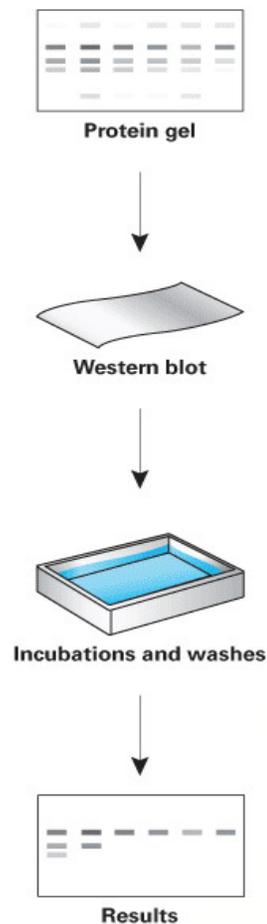
Das Spannungsgerät wird nun auf 300 V, 25 mA gestellt und für ca. 15-20 min eingeschaltet. Bevor die Samples kurz vor dem Trenngel sind, wird die Stromstärke auf 35 mA erhöht. Die Spannung bleibt gleich bei 300 V. Die Laufzeit im Trenngel beträgt ca. 60 Minuten.

3.2.12 Western Transfer

Immunoblots bzw. Western-Blots dienen dazu, Proteine auf eine Trägersubstanz zu übertragen.

Der Name „Western Blot“ geht auf seinen Erfinder Edwin Southern zurück. In Anlehnung an den von ihm durchgeführten Southern Blot (Auftrennung von DNA Fragmenten und anschließende Hybridisierung) entstand für die RNA-Auftrennung der Northern und für Proteine der Western Blot.

Abbildung 17: Schritte im Western Transfer



Legende zu Abbildung 17: Hauptschritte des Western Blot mit anschließender Detektion mittels Immunoblotting. (Quelle: http://www.clontech.com/images/products/1240_fig1.gif)

Beim Western Transfer wandern nun die Proteine in einem senkrecht zum Gel gerichteten elektrischen Feld auf eine Nitrozellulosemembran.

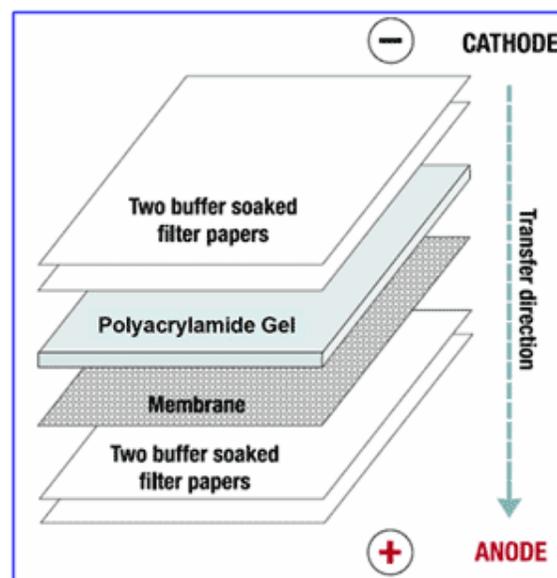
Das elektrophoretische Auftrennungsmuster bleibt erhalten und die Proteine werden so weiteren Detektionen zugänglich.

Unterschieden wird zwischen *Tankblotting* und *Semidryblotting*, wobei in diesen Experimenten mit dem ersten Verfahren gearbeitet wurde.

Tankblotting:

Gel und Membran werden zwischen Filterpapier und Schwämme gelegt und in die Transferbox, (welche mit Transferbuffer gefüllt ist) gegeben. Man lässt die Proteine nun unter Kühlung bei 350 mA, 100 V eine Stunde wandern.

Abbildung 18: Aufbau eines Western Blots



Legende zu Abbildung 18: Detaillierte Darstellung des Proteintransfers

(Quelle: <http://www.fermentas.com/techinfo/electrophoresis/img/blotting.gif>)

Nach dem Transfer kommt der Blot in eine PBS-ECL Lösung und wird mittels Bleistift auf der Rückseite beschriftet (Molekulargewicht).

Zur Überprüfung wurde nun eine Ponceau-Rot Färbung der Blots durchgeführt.

Ad Ponceau-Rot:

Synonyme:

3-Hydroxy-4-[2-sulfo-4(4-sulfophenylazo)phenylazo-]2,7-naphthalenedisulfonic acid,tetrasodiumsalt;AcidRed9;AcidRed112;

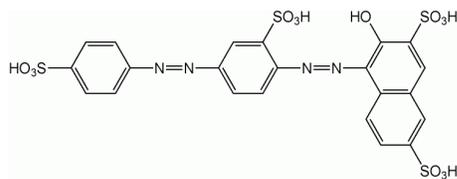
CAS-Nummer:6226-79-5

Molekulargewicht:764.62g/Mol

Summenformel: C₂₂H₁₆N₄O₁₃S₄ . 4Na

Ponceau S ist das Natriumsalz einer Diazoerbindung.

Abbildung 19: Ponceau-Rot



Es ermöglicht Proteine auf Nitrozellulosemembranen reversibel anzufärben und zu überprüfen, ob Proteine in die Nitrozellulosemembran gewandert sind. Entfärbt wird mit Wasser.

3.2.13 Immunodetektion

Zur Visualisierung spezieller Kinasen wurde die Immunodetektion verwendet, welche auf dem Prinzip der Antigen-Antikörperbindung basiert. Der primäre Antikörper bindet nun an das Epitop (aktives Zentrum) des Antigens (Protein) auf dem Blot. Anschließend wird an die Fc-Region des primären Antikörpers ein sekundärer Antikörper gebunden, welcher mittels Chemilumineszenz detektiert werden kann.

Praktische Durchführung:

- Nach dem Transfer wird der Blot 15min mit TBS-ECL am Schüttler gewaschen
- Blots mit TBS waschen
- 1 h mit 25 ml Blocking Solution/Blot, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren
- 3x5 min TBST 0,1% am Schüttler waschen
- Herstellung des primären Antikörpers (4 ml) in der Konzentration 1:1000
Inkubiert wird auf einer parafilmbespannten Glasplatte bei 4°C über Nacht
- 3x5 min TBST 0,1% am Schüttler waschen
- Herstellung des sekundären Antikörpers (4 ml) in der Konzentration 1:5000
- 3x5 min TBST 0,1% am Schüttler waschen
- 2x5 min TBS am Schüttler waschen

Je nach primären Antikörper wurde ein Anti-Rabbit bzw. Anti-Mouse als sekundärer Antikörper benutzt (siehe Abbildung 20). Die 2 stufige Detektion bewirkt eine Signalverstärkung.

An den sekundären Antikörper ist ein HRP (Horseradish peroxidase), sprich eine Peroxidase aus Merrettich gekoppelt.

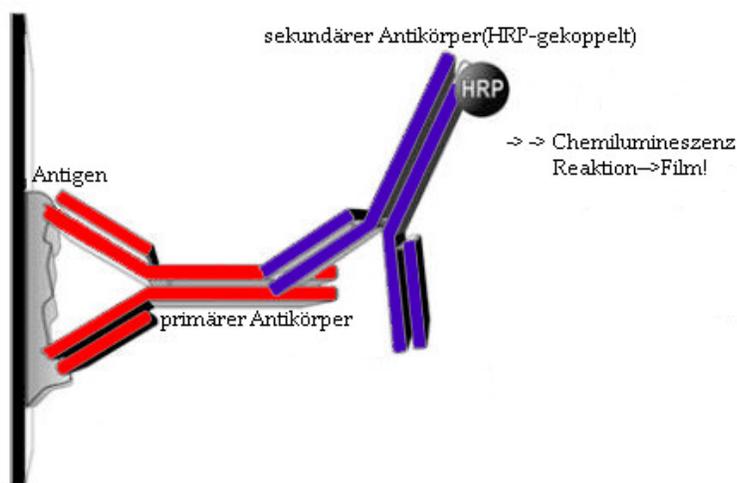
Dieses Enzym katalysiert nun die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form.

Der Nachweis erfolgt dann mittels Chemilumineszenz (ECL-Reagens).

Dieses wird kurz vor der Filmbelichtung hergestellt und für 1 min auf dem Blot zur Reaktion gebracht. Zur Belichtung wurden die Blots in Klarsichthülle eingepackt und in einer Fotokassette transportiert.

Anschließend wird der Film zw. 2-10 min belichtet, wobei das Signal nach ca. 20 min wieder verschwindet.

Abbildung 20: Schematische Darstellung der Immunodetektion



Legende zu Abbildung 20: Nach Kopplung des primären Antikörpers bindet der sekundäre Antikörper (HRP-gekoppelt) und darauf folgt die Chemilumineszenz Reaktion.

3.2.14 Stripping & Reprobing

Nach der Detektion wird nach Vorschrift gewaschen:

- 4 x 5 min TBST 0,1% am Schüttler waschen
- 30 min Stripping Buffer bei 50 °C (50ml Stripping Buffer/Blot + 350 µl Beta-Mercapt.) schütteln
- 6 x 5 min TBST 0,1% am Schüttler waschen

- 1 x 5 min TBS am Schüttler waschen
 - 1 h 25 ml Blocking Solution/Blot um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren
 - 3 x 5 min TBST 0,1% am Schüttler waschen
 - Herstellung des primären Antikörpers (4 ml) in der Konzentration 1:1000
- Inkubiert wird auf einer parafilmbespannten Glasplatte bei 4 °C über Nacht

4 RESULTATE

4.1 Austestung von 2 verschiedenen Seren

Dieser Versuch diente zunächst nur zum Erlernen der Methode des Pitassays, jedoch auch um zu untersuchen, ob es signifikante Unterschiede hinsichtlich der Osteoklastenaktivität gibt, wenn verschiedene Seren verwendet werden. Untersucht wurden Bio Whittaker und Lot 121K3368.

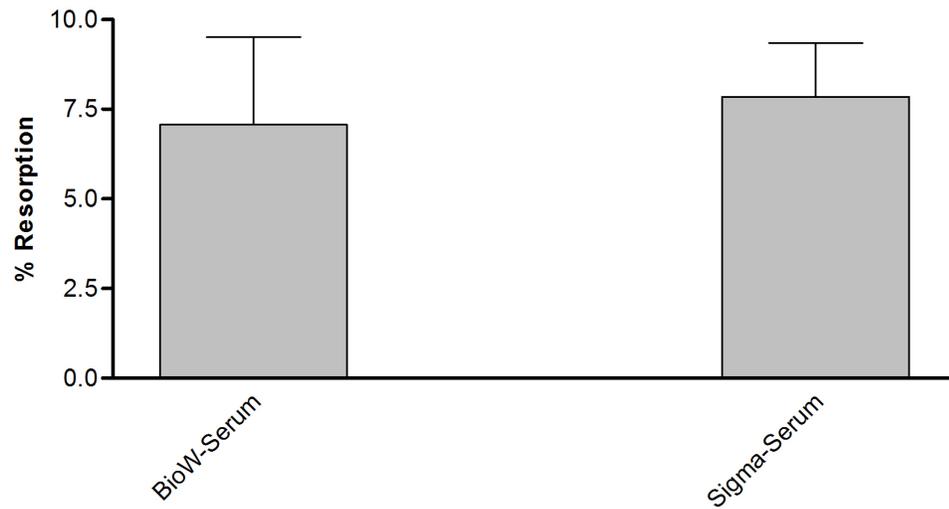
Geschnitten wurden 20 Knochenplättchen, welche wie folgt zu je 4 Stück/Well in einer 48-Well Platte eingeklebt wurden und der Versuch laut (siehe Kapitel 3, Material und Methoden) durchgeführt.

Tabelle 17: Versuchsanordnung auf der Well Platte

Bio Whittaker	Bio Whittaker	Lot 121K3368	Lot 121K3368	Lot 121K3368	Biow(ohne Plättchen)
---------------	---------------	--------------	--------------	--------------	----------------------

Die Auswertung in Abbildung 21 ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden verschiedenen Seren, wobei das Lot 121K3368 Serum mit 7,8% Resorptionsfläche etwas höher war, als das Bio Whittaker Serum mit 7%. Aufgrund der Testergebnisse ist es möglich, beide Seren als gleichwertig anzusehen.

Abbildung 21: Grafische Auswertung



Legende zu Abbildung 21: Die Auswertung einer 5 Tage alten Osteoblasten Osteoklasten Kokultur (Pitassay) zeigt keinen signifikanten Unterschied.

4.2 Ergebnis der Resorptionsaktivität von Osteoklasten durch Roburin B

Die zu testende Substanz Roburin B (SASN6) wurde als 1×10^{-4} M Stammlösung hergestellt und daraus die weiteren Konzentrationen 5×10^{-5} M, 1×10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 1×10^{-6} M und 1×10^{-7} M hergestellt. Die Kontrollgruppe blieb unbehandelt.

Nach Zugabe der Substanz wurde die Wellplatte für weitere 48 Stunden inkubiert, die Plättchen mittels Toluidinblau gefärbt und am Computer digital ausgewertet. Das Ergebnis dieser mit Excel errechneten Resorptionsflächen wird in Tabelle 18 dargestellt. Die weitere Versuchsabfolge ist ausführlich in Kapitel 3, Material und Methoden aufgeführt.

Tabelle 18: Resorptionsflächen der einzelnen Knochenplättchen

Kontrolle	Knpl 16	Knpl 2	Knpl 3	Knpl 4	Knpl 5	Knpl 6	Knpl 7	Knpl 8
Stat. Funktion	Fläche							
Grundeinheit	µm ²							
Anzahl	29	27	57	103	76	72	69	"verloren"
Summe	59675,11	81567,17	191698,53	219859,61	328449,63	251603,15	184680,39	
Mittelwert	2057,76	3021,01	3363,13	2134,56	4321,71	3494,49	2676,53	
Gesamtfläche	4699790,96	6149836,12	6737636,35	5698196,33	4770898,51	6885859,49	5761444,59	
% Resorption	1,27	1,33	2,85	3,86	6,88	3,65	3,21	

SASN6(5x10-5 M)	Knpl 8	Knpl 9	Knpl 10	Knpl 11	Knpl 12	Knpl 13	Knpl 14	Knpl 15
Stat. Funktion	Fläche							
Grundeinheit	µm ²							
Anzahl		1	5		5	5	9	4
Summe		4257,02	14804,02		6563,77	18336,39	13303,47	5433,70
Mittelwert		4257,02	2960,80		1312,75	3667,28	1478,16	1358,42
Gesamtfläche	1,00	6384505,58	6077012,49	1,00	6160811,86	6773725,45	7559538,66	6445127,86
% Resorption	0	0,07	0,24	0	0,11	0,27	0,18	0,08

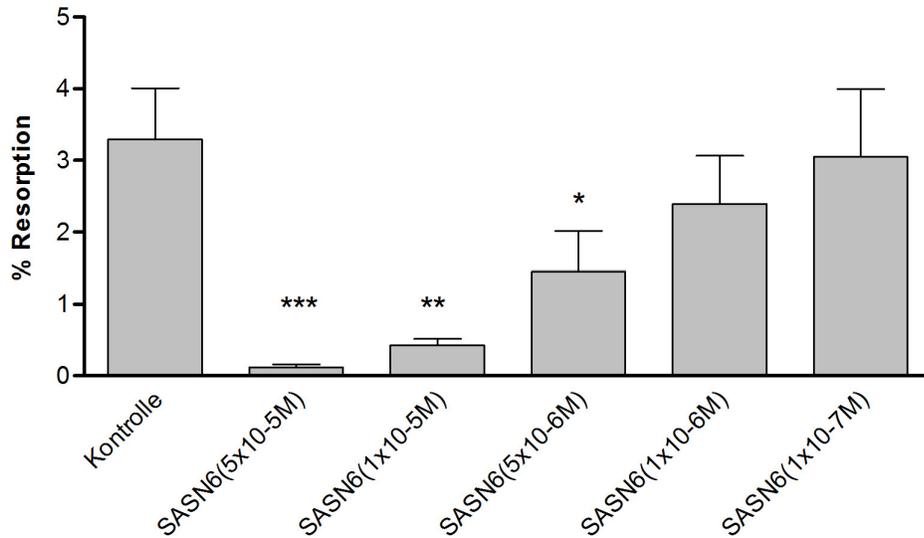
SASN6(1x10-5 M)	Knpl 16	Knpl 17	Knpl 18	Knpl 19	Knpl 20	Knpl 21	Knpl 22	Knpl 23
Stat. Funktion	Fläche							
Grundeinheit	µm ²							
Anzahl	30	13	11	26	11	4	28	31
Summe	49298,20	27605,36	17241,26	41355,03	17090,98	5678,35	28107,49	60297,24
Mittelwert	1643,27	2123,49	1567,39	1590,58	1553,73	1419,59	1003,84	1945,07
Gesamtfläche	6782127,64	7788677,72	8790613,12	7940361,00	8142250,03	5997434,02	6937618,23	6947121,37
% Resorption	0,73	0,35	0,2	0,52	0,21	0,09	0,41	0,87

SASN6(5x10-6 M)	Knpl 24	Knpl 25	Knpl 26	Knpl 27	Knpl 28	Knpl 29	Knpl 30	Knpl 31
Stat. Funktion	Fläche							
Grundeinheit	µm ²							
Anzahl	118	44	8	8	4	55	53	12
Summe	313903,08	86731,75	15583,43	15020,72	6451,93	117768,12	196391,26	16516,62
Mittelwert	2660,20	1971,18	1947,93	1877,59	1612,98	2141,24	3705,50	1376,38
Gesamtfläche	7487257,93	8485180,97	7279583,36	5658177,58	5909106,18	5621062,09	5720858,47	5938290,16
% Resorption	4,19	1,02	0,21	0,27	0,11	2,1	3,43	0,28

SASN6(1x10-6 M)	Knpl 32	Knpl 33	Knpl 34	Knpl 35	Knpl 36	Knpl 37	Knpl 38	Knpl 39
Stat. Funktion	Fläche							
Grundeinheit	µm ²							
Anzahl	67	106	5	34	4	19	32	66
Summe	247393,90	386549,62	15909,64	128481,73	15111,59	50480,71	130047,52	268129,09
Mittelwert	3692,45	3646,69	3181,93	3778,87	3777,90	2656,88	4063,99	4062,56
Gesamtfläche	6174538,23	7429122,98	6616813,52	6829375,39	6046302,33	5725631,60	5059125,51	6521608,52
% Resorption	4,01	5,2	0,24	1,88	0,25	0,88	2,57	4,11

SASN6(1x10-7 M)	Knpl 40	Knpl 41	Knpl 42	Knpl 43	Knpl 44	Knpl 45	Knpl 46	Knpl 47
Stat. Funktion	Fläche							
Grundeinheit	µm ²							
Anzahl	7	107	44	60	53	71	57	18
Summe	11532,62	517135,39	144130,40	171366,44	206233,43	297034,62	220729,89	34633,98
Mittelwert	1647,52	4833,04	3275,69	2856,11	3891,20	4183,59	3872,45	1924,11
Gesamtfläche	7435013,37	6030054,83	8220468,91	6762360,59	7495332,74	6612224,47	6020005,29	7439177,18
% Resorption	0,16	8,58	1,75	2,53	2,75	4,49	3,67	0,47

Abbildung 22: Grafische Auswertung der Resorptionsflächen unter verschiedenen SASN6 Konzentrationen



Legende zu Abbildung 22:

Graphische Auswertung des murinen OB-OC Pitassays nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden mit der Versuchssubstanz SASN6 in den Konzentrationen $5 \times 10^{-5} \text{M}$, $1 \times 10^{-5} \text{M}$, $5 \times 10^{-6} \text{M}$, $1 \times 10^{-6} \text{M}$, $1 \times 10^{-7} \text{M}$ und der Kontrolle ohne SASN6.

*** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$

Die Grafik zeigt eine statistisch signifikante Hemmung der Resorption im Konfidenzintervall 95% bei $5 \times 10^{-6} \text{M}$ gegenüber der Kontrollgruppe. Die Resorptionsfläche der Pits betrug hier 1,54% im Gegensatz zur Kontrolle mit 3,29%. Im Konfidenzintervall 99%, was einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,01$ entspricht, stellte sich die Verdünnungsstufe $1 \times 10^{-5} \text{M}$ als sehr signifikant mit einer Resorptionsfläche von 0,42% gegenüber der Kontrollgruppe heraus.

Die höchste Signifikanz mit einem Konfidenzintervall von 99,9% ergab sich bei der Konzentration $5 \times 10^{-5} \text{M}$ gegenüber der Kontrolle, wobei die Resorptionsfläche hierbei auf 0,12% sank.

Zur Verifizierung der Ergebnisse des oben beschriebenen Pitassays wurde der Versuch mit identischem Ablauf, jedoch einer größeren Anzahl an Konzentrationen ($5 \times 10^{-5} \text{M}$, $3 \times 10^{-5} \text{M}$, $1 \times 10^{-5} \text{M}$, $5 \times 10^{-6} \text{M}$, $3 \times 10^{-6} \text{M}$, $1 \times 10^{-6} \text{M}$, $3 \times 10^{-7} \text{M}$ und $1 \times 10^{-7} \text{M}$) wiederholt.

Tabelle 19: Resorptionsflächen der einzelnen Knochenplättchen

Kontrolle	Knpl 1	Knpl 2	Knpl 3	Knpl 4	Knpl 5	Knpl 6	Knpl 7	Knpl 8
Stat. Funktion	Fläche							
Grundeinheit	μm^2							
Anzahl	118	167	3	51	140	22	75	49
Summe	641104,96	382665,42	3922,65	109063,02	363528,65	43503,35	148668,18	117155,31
Mittelwert	5433,09	2291,41	1307,55	2138,49	2596,63	1977,42	1982,24	2390,92
Gesamtfläche	5628740,80	6581775,27	4991723,92	5578982,41	4653187,47	4856836,87	5464898,11	5806316,84
% Resorption	11,39	5,81	0,08	1,95	7,81	0,9	2,72	2,02

SASN6(5x10-5 M)	Knpl 1	Knpl 2	Knpl 3	Knpl 4	Knpl 5	Knpl 6	Knpl 7	Knpl 8
Stat. Funktion	Fläche							
Grundeinheit	μm^2							
Anzahl	4			2				6
Summe	5448,84			2999,95				7245,32
Mittelwert	1362,21			1499,97				1207,55
Gesamtfläche	5087265,62	1,00	1,00	7990210,26	1,00	1,00	1,00	5728774,84
% Resorption	0,11	0	0	0,04	0	0	0	0,13

SASN6(3x10-5 M)	Knpl 1	Knpl 2	Knpl 3	Knpl 4	Knpl 5	Knpl 6	Knpl 7	Knpl 8
Stat. Funktion	Fläche							
Grundeinheit	μm^2							
Anzahl		2		1	3	5	20	4
Summe		2125,01		1739,39	7146,29	11152,82	23166,60	4213,91
Mittelwert		1062,51		1739,39	2382,10	2230,56	1158,33	1053,48
Gesamtfläche	1,00	5067011,59	1,00	5400779,58	5789257,32	5064286,59	5256173,85	5676381,16
% Resorption	0	0,04	0	0,03	0,12	0,22	0,44	0,07

SASN6(1x10-5 M)	Knpl 1	Knpl 2	Knpl 3	Knpl 4	Knpl 5	Knpl 6	Knpl 7	Knpl 8
Stat. Funktion	Fläche							
Grundeinheit	μm^2							
Anzahl	5	6	55	40	12	8	9	
Summe	6105,92	3554,50	83399,76	70563,48	16151,96	11287,97	12077,86	
Mittelwert	1221,18	592,42	1516,36	1764,09	1346,00	1411,00	1341,98	
Gesamtfläche	5904068,60	5637353,86	5311065,36	5101589,65	3861267,18	5312632,32	5306496,11	1,00
% Resorption	0,1	0,06	1,57	1,38	0,42	0,21	0,23	0

SASN6(5x10-6 M)	Knpl 1	Knpl 2	Knpl 3	Knpl 4	Knpl 5	Knpl 6	Knpl 7	Knpl 8
Stat. Funktion	Fläche							
Grundeinheit	μm^2							
Anzahl	9	43	16	48	5	85	15	20
Summe	32921,39	78053,45	26609,26	115836,50	8841,40	204873,84	30930,35	31918,30
Mittelwert	3657,93	1815,20	1663,08	2413,26	1768,28	2410,28	2062,02	1595,91
Gesamtfläche	4950239,57	4963165,57	5149682,05	6410197,96	4474952,02	5638654,03	5684797,33	5978565,21
% Resorption	0,67	1,57	0,52	1,81	0,2	3,63	0,54	0,53

SASN6(3x10-6 M)	Knpl 1	Knpl 2	Knpl 3	Knpl 4	Knpl 5	Knpl 6	Knpl 7	Knpl 8
Stat. Funktion	Fläche							
Grundeinheit	μm^2							
Anzahl	12	21	59	6		82	7	11
Summe	15697,60	65588,80	90455,18	6419,31		268726,75	8017,73	18622,99
Mittelwert	1308,13	3123,28	1533,14	1069,88		3277,16	1145,39	1693,00
Gesamtfläche	4895857,18	4496980,39	5558324,11	4890959,40	1,00	5488647,23	4851221,43	4936834,75
% Resorption	0,32	1,46	1,63	0,13	0	4,9	0,17	0,38

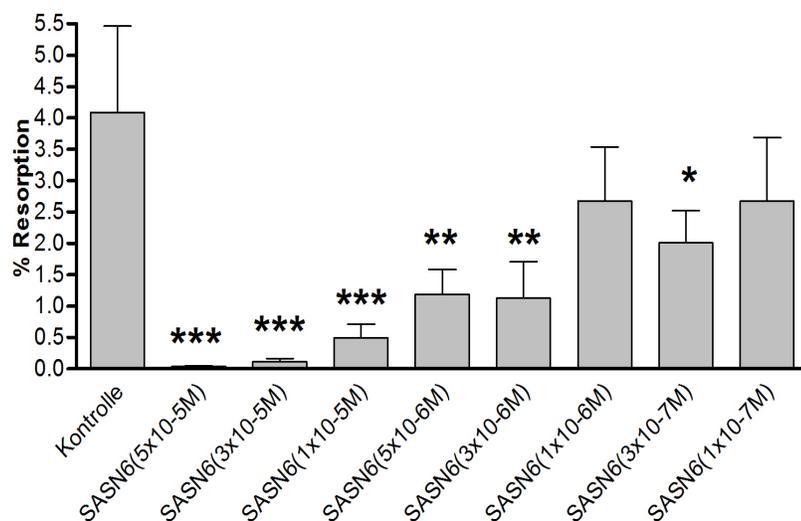
SASN6(1x10-6 M)	Knpl 1	Knpl 2	Knpl 3	Knpl 4	Knpl 5	Knpl 6	Knpl 7	Knpl 8
Stat. Funktion	Fläche							

Grundeinheit	μm^2								
Anzahl	22	8	129	81	3	5	115	85	
Summe	93307,17	11780,77	416353,40	183801,96	4380,51	15499,55	347925,42	217812,65	
Mittelwert	4241,24	1472,60	3227,55	2269,16	1460,17	3099,91	3025,44	2562,50	
Gesamtfläche	5654413,37	4977025,92	6430757,23	5427967,86	4903137,45	4573221,05	6775354,16	5407077,72	
% Resorption	1,65	0,24	6,47	3,39	0,09	0,34	5,14	4,03	

SASN6(3x10-7 M)	Knpl 1	Knpl 2	Knpl 3	Knpl 4	Knpl 5	Knpl 6	Knpl 7	Knpl 8
Stat. Funktion	Fläche							
Grundeinheit	μm^2							
Anzahl	12	77	15	46	31	43	99	29
Summe	50395,66	126611,85	69985,62	118295,88	80369,52	120382,44	328561,47	47977,06
Mittelwert	4199,64	1644,31	4665,71	2571,65	2592,57	2799,59	3318,80	1654,38
Gesamtfläche	5266457,56	5857667,82	5828144,83	5670387,09	4726904,68	6300659,61	6164762,47	6548474,09
% Resorption	0,96	2,16	1,2	2,09	1,7	1,91	5,33	0,73

SASN6(1x10-7 M)	Knpl 1	Knpl 2	Knpl 3	Knpl 4	Knpl 5	Knpl 6	Knpl 7	Knpl 8
Stat. Funktion	Fläche							
Grundeinheit	μm^2							
Anzahl	119	35	123	28	28	48	6	18
Summe	308510,16	75329,61	546586,16	103322,93	90131,30	159435,38	9016,16	19527,05
Mittelwert	2592,52	2152,27	4443,79	3690,10	3218,98	3321,57	1502,69	1084,84
Gesamtfläche	5968951,39	5325063,18	6327052,17	5241770,60	6311330,11	7015171,88	6262473,45	5238288,33
% Resorption	5,17	1,41	8,64	1,97	1,43	2,27	0,14	0,37

Abbildung 23: Grafische Auswertung der Resorptionsflächen unter verschiedenen SASN6 Konzentrationen



Legende zu Abbildung 23:

Wirkung von SASN6 auf Osteoklasten in Maus Cokulturmodell in den Konzentrationen 5x 10⁻⁵M, 3x 10⁻⁵M, 1x 10⁻⁵M, 5x 10⁻⁶M, 3x 10⁻⁶M, 1x 10⁻⁶M, 3x 10⁻⁷M und 1x 10⁻⁷M 5x und der Kontrolle.

***p<0,001 **p<0,01 *p<0,05

Dieses Experiment bestätigt ebenfalls die Hemmwirkung durch SASN6 Konzentrationen gegenüber der Kontrolle im Pitassay.

Die Konzentration 3x10⁻⁷M zeigte sich als statistisch signifikant im Konfidenzintervall von 95% gegenüber der Kontrollgruppe und es ergab sich eine Resorptionsfläche von 2,01% gegenüber 4,08% in der Kontrolle. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p=0,01, was einem Konfidenzintervall von 99% entspricht, wurden die Konzentrationen 5x10⁻⁶M und 3x10⁻⁶M als sehr signifikant, verglichen mit der Kontrolle ermittelt. 5x10⁻⁶M ergab eine Fläche von 1,18% und 3x10⁻⁶M eine Resorptionsfläche von 1,12%.

Als hoch signifikant hemmend, im Konfidenzintervall 99,9% mit der geringsten Irrtumswahrscheinlichkeit von p=0,001 wirkte SASN6 in den Konzentrationen 5x10⁻⁵M, 3x10⁻⁵M und 1x10⁻⁵M gegenüber der Kontrollgruppe ohne SASN6.

Der unerwartet hohe Wert bei ($1 \times 10^{-6} \text{M}$) liegt vermutlich an einem Pipettierfehler, jedoch zeigt sich aufgrund der höheren Anzahl an Roburin B Konzentrationen ebenfalls eine von der SASN6 Konzentration abhängige Knochenresorption, die bei $5 \times 10^{-5} \text{M}$ auf unter 0,04% Knochenresorptionsfläche sinkt.

4.3 Targeting verschiedener intrazellulärer Kinasen auf einer RAW 264.7 Zellkultur unter Einfluss von Roburin B

Aufgrund der Tatsache, dass RANKL/RANK Interaktionen eine zentrale Rolle in der Regulation von Osteoklastendifferenzierung und Osteoklastenfunktion besitzen, (Boyle, et al., 2003) wurden nun weitere Untersuchungen hinsichtlich der biochemischen Signalkaskaden angestellt.

MAP Kinasen werden durch die RANKL Stimulation in den Osteoklastenpräkursorzellen aktiviert. Speziell die p38MAPK und JNK spielen eine große Rolle während der RANKL induzierten Osteoklastendifferenzierung.

(Lee, 2002), (Li, et al., 2002), (David, et al., 2002), (Collin-Osdoby, et al., 2003)

Es wurden jeweils 2 Gelelektrophoresen und 2 Westernblots durchgeführt. Grund dafür ist, das Zelllysate effektiver zu nutzen und mehr Proteine untersuchen zu können. Die Osteoklastenherstellung erfolgte laut Kapitel 3.2.8. aus RAW 264.7 Zellen.

Detektiert, laut Kapitel 3.2.13 wurden folgende Proteine mittels Antikörper:

1.Detektion: p42/p44 MAPK, phospho p38 MAPK

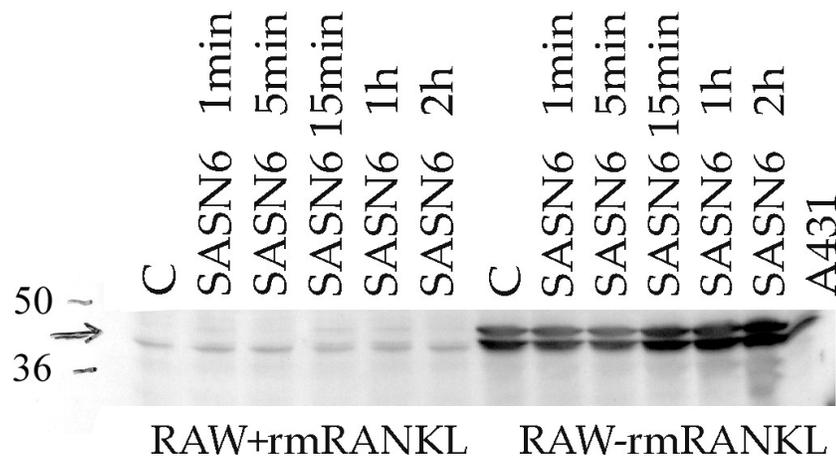
2.Detektion: p-AKT

3.Detektion: p-NF κ B

4.Detektion: beta Aktin

Abbildung 24 zeigt den Blot mit detektierter p42/p44 MAPK. Die Belichtungszeit betrug 10 min. Die linke Spalte stellt die Gruppe mit RANKL dar, wobei sich eine leichte Signalminderung nach 15 min gegenüber der Kontrollgruppe feststellen lässt. Nach 15 min, 1 Stunde und 2 Stunden hingegen verstärkt sich das Signal in der Gruppe ohne RANKL gegenüber der Kontrollgruppe.

Abbildung 24: phospho MAPK p42/p44



Legende zu Abbildung 24: 5 Tage alte RAW264.7 Zellen mit unterschiedlichen Applikationszeiten von SASN6 und der unbehandelten Kontrollgruppe (C) einmal mit bzw. ohne RANKL. Als primärer Antikörper diente phospho MAPK p42/p44 in einer Konzentration von 1:1000. Der sekundäre Antikörper war ein Antimouse IgG 1:2000. Die Belichtungszeit betrug 10 Minuten.

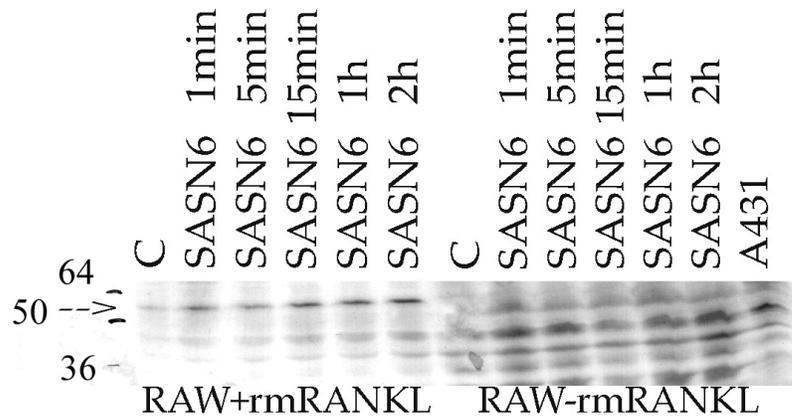
Nach dem Stripping und Reprobing (siehe Methoden) wurde p-AKT detektiert, welcher jedoch kein sichtbares Signal lieferte.

In Abbildung 25 wird das phosphorylierte NF κ -B dargestellt.

Man sieht deutlich in der Gruppe mit RANKL, dass bereits nach einer Minute SASN6 Inkubation die Banden intensiver werden und in der Zeit 15 min, 1 und 2 Stunden noch einmal an Aktivität im Vergleich zu Kontrolle mit RANKL zunehmen.

Die Gruppe ohne RANKL Zugabe bleibt in der Signalstärke unverändert, verglichen mit der Kontrolle ohne RANKL. Die Belichtungszeit betrug 15 min.

Abbildung 25: phospho NF kappa B

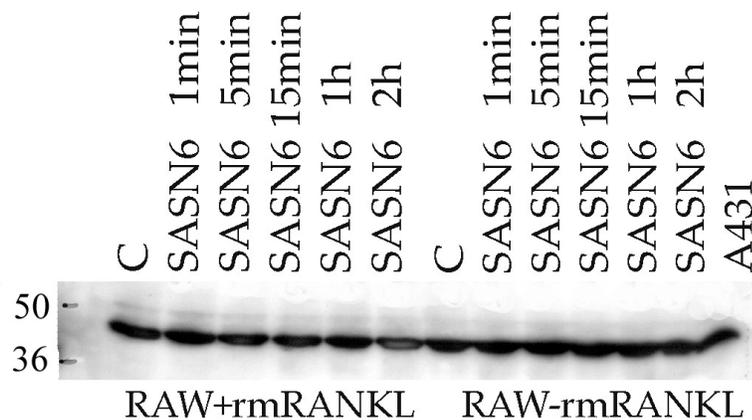


Legende zu Abbildung 25: 5 Tage alte RAW264.7 Zellen mit unterschiedlichen Applikationszeiten von SASN6 und der Kontrollgruppe C ohne SASN6 einmal mit bzw. ohne RANKL. Als primärer Antikörper diente phospho NF kappa B in einer Konzentration von 1:1000. Der sekundäre Antikörper war ein Antirabbit IgG 1:5000. Die Belichtungszeit betrug 15 Minuten.

Abbildung 26 zeigt das Beta Aktinsignal nach dem 3. Stripping mit einer Belichtungszeit von 10 min.

Diese Detektion wurde durchgeführt um etwaige Zweifel bezüglich gleichmäßiger Proteinbeladung der einzelnen Samples auszuräumen, weil der Antikörper phospho-AKT kein Signal lieferte. Der Film lieferte jedoch einheitliche Intensität in allen Gruppen bei einer Belichtungszeit von 10 min.

Abbildung 26: anti beta Aktin



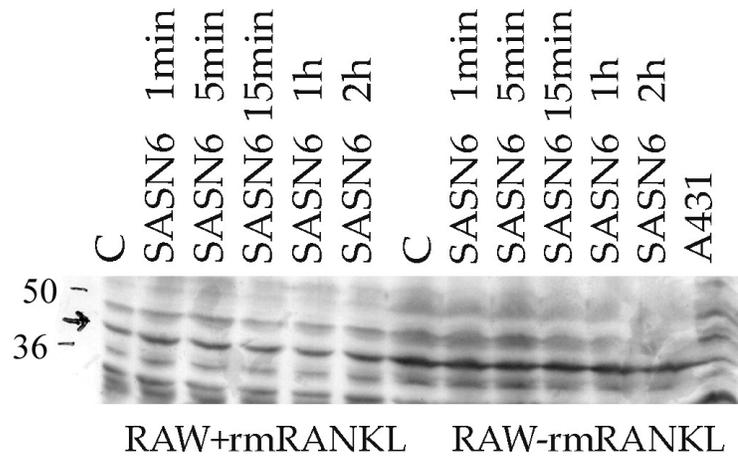
Legende zu Abbildung 26: 5 Tage alte RAW264.7 Zellen mit unterschiedlichen Applikationszeiten von SASN6 und der Kontrollgruppe C ohne SASN6 einmal mit bzw. ohne RANKL. Als primärer Antikörper diente Anti Beta Aktin in einer Konzentration von 1:2000. Der sekundäre Antikörper war ein Antimouse IgG 1:5000. Die Belichtungszeit betrug 10 Minuten.

In Abbildung 27 wurde nun die zweite Nitrozellulosemembran verwendet, da eine Immunodetektion nach mehr als 4-5 Stripping und Reprobingvorgängen keine brauchbare Signalstärke mehr liefert.

Detektiert wurde als erstes die phospho-p-38 MAP Kinase, welche in der RANKL Gruppe ein verstärktes Signal nach 1 min und 5 min SASN6 Applikation gegenüber der Kontrolle lieferte und danach in den Zeiten 15 min, 1h und 2h wieder die Intensität der Kontrolle erlangte. In der Gruppe ohne RANKL war weder eine

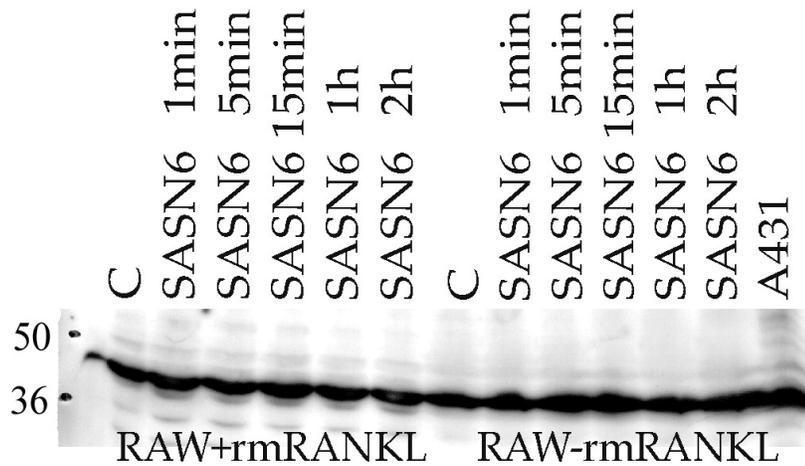
Verstärkung noch eine Abschwächung des Signals im Vergleich zur der Kontrolle zu sehen.

Abbildung 27: phospho p38 MAPK



Legende zu Abbildung 27: 5 Tage alte RAW264.7 Zellen mit unterschiedlichen Applikationszeiten von SASN6 und der Kontrollgruppe C ohne SASN6 einmal mit bzw. ohne RANKL. Als primärer Antikörper diente Phospho p38 MAPK in einer Konzentration von 1:1000. Der sekundäre Antikörper war ein Antirabbit IgG 1:5000. Die Belichtungszeit betrug 10 Minuten.

Abbildung 28: Anti beta Aktin



Legende zu Abbildung 28: 5 Tage alte RAW264.7 Zellen mit unterschiedlichen Applikationszeiten von SASN6 und der Kontrollgruppe C ohne SASN6 einmal mit bzw. ohne RANKL. Als primärer Antikörper diente Anti Beta Aktin in einer Konzentration von 1:2000. Der sekundäre Antikörper war ein Antimouse IgG 1:5000. Die Belichtungszeit betrug 10 Minuten.

Tabelle 20: Übersicht der benutzen Antikörper

		Inhibition: SASN 6 (1x10⁻⁵M)												
MG		RAW 264,7 +rmRANKL						RAW 264.7						
		C	1 min	5 min	15 min	60 min	120 min	C	1 min	5 min	15 min	60 min	120 min	
44kD	Phospho MAPK p42/p44 (127)	●	●	●	●	●	●	●	●	●	▲▲	▲▲	▲▲	1.Str
60kD	Phospho AKT (159)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.Str
75kD	Phospho NF kB (160)	●	▲	▲	▲▲	▲▲	▲▲	●	●	●	●	●	●	3.Str
	Anti Beta Aktin (142)	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	4.Str
43kD	Phospho p38 MAPK (157)	●	▲	▲	●	●	●	●	●	●	●	●	●	1.Str
60kD	Phospho AKT (159)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.Str
60kD	Phospho AKT (159)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.Str
	Anti Beta Aktin (142)	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	4.Str

Legende zu Tabelle 20: Die Tabelle zeigt die Detektion der Proteine mit den angeführten Antikörpern, wobei die unterschiedlichen SASN6 Applikationszeiten mit der Kontrollgruppe verglichen werden.

Zeichentabelle:

●	gleichbleibende Signalstärke
▲	leichte Signalverstärkung
▲▲	starke Signalverstärkung
▼	leichte Signalabschwächung
▼▼	starke Signalabschwächung

4.4 Austestung von 2 verschiedenen phospho AKT AK mit NIH3T3 Zellen und 2 unterschiedl. Lysisbuffern

Das folgende Experiment in Abbildung 29 zeigt einen Vergleichstest bzw. Funktionstest von 2 verschiedenen phospho-AKT Antikörpern.

Für diesen Versuch wurde mit NIH 3T3 (Passage 3) Zellen gearbeitet. Es gab eine Kontrollgruppe ohne PDGF, eine mit 15 min und eine mit einer Stunde PDGF Inkubation. Für biologische Aktivität erwies sich 10 ng/ml PDGF als vorteilhaft.

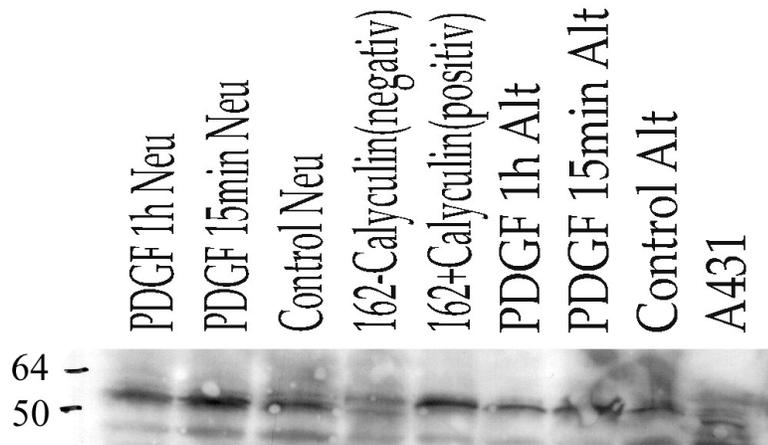
Jene Gruppen in Abbildung 29 mit „NEU“ gekennzeichnet wurden mit einem „Hot Lysis Buffer“ lysiert. In den Gruppen mit der Aufschrift „ALT“ wurde der Frackleton Buffer, welcher auch für die restlichen Versuche benutzt wurde.

Gut sichtbar im Blot nun die Negativ- und Positivprobe des phospho-AKT, sowie auch die eigenen Gruppen, wobei die Signale mit der Hot Lysis Buffer Lyse stärker ausgeprägt sind.

Im Grunde diente dieser Versuch nur zur Verifizierung des neuen Antikörpers für spätere Arbeiten.

Durch dieses Experiment konnte man nachweisen, dass die Wahl des Lysisbuffer erhebliche Rolle bei der späteren Immunodetektion spielt, bzw. die Extraktion mittels Hot Lysis Buffer effizienter ist.

Abbildung 29: phospho AKT



Legende zu Abbildung 29: 5 Tage alte NIH3T3 Zellen mit unterschiedlichen Applikationszeiten von PDGF und der Kontrollgruppe. 162 Calyculin wurde einmal als Positiv und Negativprobe detektiert. Als primärer Antikörper diente phospho AKT in einer Konzentration von 1:1000. Der sekundäre Antikörper war ein Antirabbit IgG 1:2000. Die Belichtungszeit betrug 5 Minuten.

NIH 3T3 Passage

		PGDF 1h Neu	PGDF 15min Neu	C-Neu	162- Cal	162+Cal	PGDF 1h Alt	PGDF 15min Alt	C-Alt	A431
63kD	Phospho AKT (163)	●	▲	●		▲	●	▲	●	●

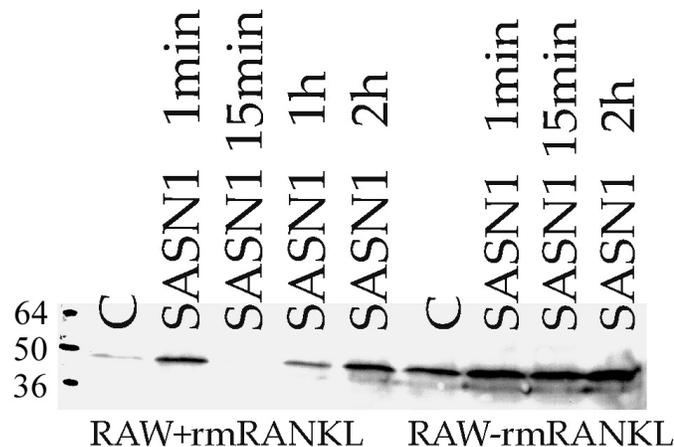
4.5 Targeting verschiedener Kinasen auf einer RAW 264.7 Zellkultur unter Einfluss von Vescalagin

Nach der Untersuchung von SASN6 wurde SASN1 untersucht. Die Arbeitstechniken bzw. der Versuchsaufbau wurden bis auf die Testsubstanz äquivalent zu Experiment 4.3 gelassen, um bessere Vergleichbarkeit zu erzielen.

In der RANKL behandelten Gruppe kam es zu einem starken Signalanstieg nach der Inkubation mit SASN1 für eine Minute und in der Zeitspanne von einer bis zwei Stunden dann allmählich wieder intensiver gegenüber der Kontrolle wurde.

Die Gruppe ohne RANKL zeigte im Vergleich zu der Kontrolle einen etwa gleich bleibendes , jedoch stärkeres Signal in den Gruppen mit SASN1 im Vergleich zur Kontrolle.

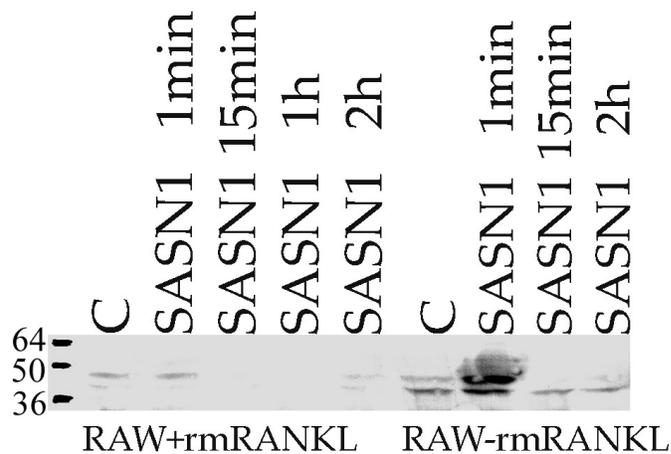
Abbildung 30: phospho AKT



Legende zu Abbildung 30: 5 Tage alte RAW264.7 Zellen mit unterschiedlichen Applikationszeiten von SASN1 und der Kontrollgruppe C ohne SASN1 mit bzw. ohne RANKL. Primärer Antikörper phospho AKT in einer Konzentration von 1:1000. Sekundärer Antikörper IgG 1:5000. Die Belichtungszeit betrug 10 Minuten.

Abbildung 31 zeigt das Signal der phospho p38 MAPK. In den RANKL behandelten Zellen bleibt das Signal nach einer Minute SASN1 Zugabe in etwa gleich wie in der Kontrolle. Zwischen 15 min und einer Stunde ist das Signal reduziert, wohingegen es nach zwei Stunden wieder zunimmt. Die Proben ohne RANKL zeigen einen sehr starken Anstieg nach etwa einer Minute, der dann jedoch in den weiteren Applikationen 15 min und 2 Stunden verschwindet.

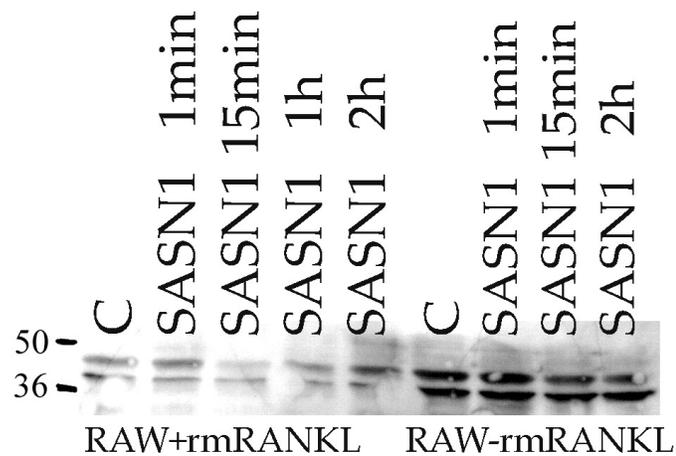
Abbildung 31: phospho p38 MAPK



Legende zu Abbildung 31: 5 Tage alte RAW264.7 Zellen mit unterschiedlichen Applikationszeiten von SASN1 und der Kontrollgruppe C ohne SASN1 einmal mit bzw. ohne RANKL. Als primärer Antikörper diente phospho p38 MAPK in einer Konzentration von 1:1000. Der sekundäre Antikörper war ein Antirabbit IgG 1:5000. Die Belichtungszeit betrug 9 Minuten.

Die nichtphosphorylierte p38 MAPK wurde in Abbildung 32, obere Bande detektiert und liefert in den RANKL behandelten Zellen ein gleich bleibendes Signal gegenüber der Kontrolle. Zwischen 15 min und einer Stunde wird das Signal schwächer und steigt nach 2 Stunden wieder an. Die Proben ohne RANKL ergaben in etwa gleich intensive Banden, eventuell leicht schwächere Signale nach 15 min und 2 Stunden.

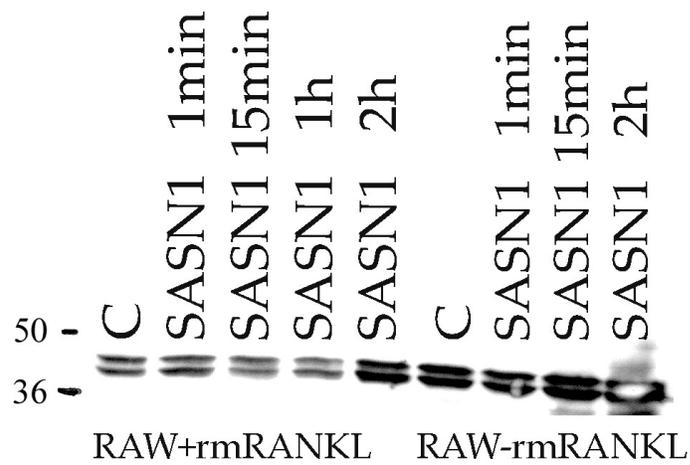
Abbildung 32: p38 MAPK



Legende zu Abbildung 32: 5 Tage alte RAW264.7 Zellen mit unterschiedlichen Applikationszeiten von SASN1 und der Kontrollgruppe C ohne SASN1 einmal mit bzw. ohne RANKL. Als primärer Antikörper diente p38 MAPK in einer Konzentration von 1:1000. Der sekundäre Antikörper war ein Antirabbit IgG 1:5000. Die Belichtungszeit betrug 5 Minuten.

Abbildung 33 zeigt die 2. Nitrozellulosemembran. Untersucht wurde die Signalstärke von phospho p42/p44 MAPK. Deutlich zu sehen, dass SASN1 in der RANKL behandelten Gruppe nach 1 Minute ein leicht und nach 2 Stunden ein sehr starkes Signal gegenüber der Kontrollgruppe zeigt. Die RANKL unbehandelte Gruppe weist keine Signaländerung gegenüber der Kontrollgruppe auf.

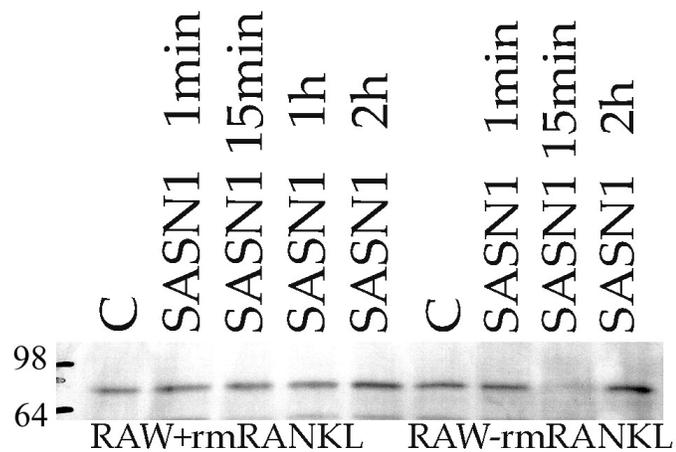
Abbildung 33: p42/p44 MAPK



Legende zu Abbildung 33: 5 Tage alte RAW264.7 Zellen mit unterschiedlichen Applikationszeiten von SASN1 und der Kontrollgruppe C ohne SASN1 einmal mit bzw. ohne RANKL. Als primärer Antikörper diente p42/p44 MAPK in einer Konzentration von 1:1000. Der sekundäre Antikörper war ein Antimouse IgG 1:5000. Die Belichtungszeit betrug 10 Minuten.

Phosphorylierter NF- κ B wurde in Abbildung 34 detektiert. In den RANKL behandelten Gruppen wurde das Signal erst nach 2 Stunden SASN1 Inhibition stärker. Die andere Gruppe zeigt ein sehr schwaches Signal nach 15 min und ein starker Signal nach 2 Stunden SASN1 Zugabe.

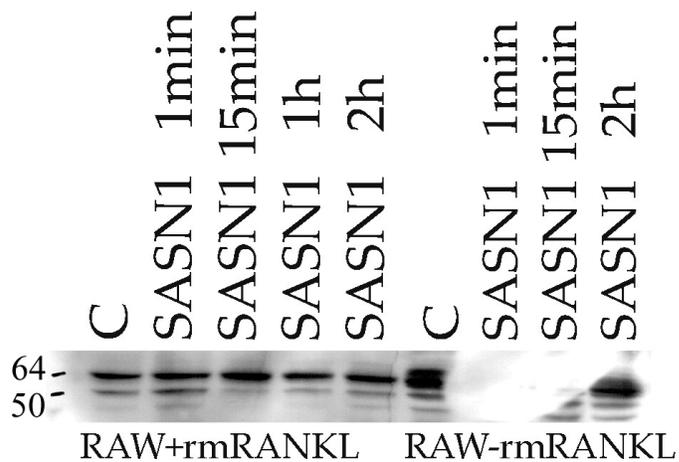
Abbildung 34: phospho NF kappa B



Legende zu Abbildung 34: 5 Tage alte RAW264.7 Zellen mit unterschiedlichen Applikationszeiten von SASN1 und der Kontrollgruppe C ohne SASN1 mit oder ohne RANKL. Primärer Antikörper phospho NF kappa B, Konzentration 1:1000. Sekundärer Antikörper antirabbit IgG, 1:5000. Die Belichtungszeit betrug 9 Minuten.

Bedingt durch eine Luftblase zwischen Film und Nitrozellulosemembran, welche bei der Entwicklung einen hellen Fleck in der RANKL unbehandelten Gruppe hinterließ, verhindert in diesem Bereich eine exakte Aussage, wobei die Priorität ohnehin auf der RANKL stimulierten Gruppe liegt, da nur hier Osteoklasten entstanden sind. In der RANKL behandelten Gruppe allerdings lässt sich eine Signalverstärkung nach etwa 15 min SASN1 Applikation erkennen, welche dann nach einer bzw. 2 Stunden wieder auf die Stärke der Kontrollgruppe absinkt.

Abbildung 35: phospho Src



Legende zu Abbildung 35: 5 Tage alte RAW264.7 Zellen mit unterschiedlichen Applikationszeiten von SASN1 und der Kontrollgruppe C ohne SASN1 einmal mit bzw. ohne RANKL. Als primärer Antikörper diente phospho Src in einer Konzentration von 1:1000. Der sekundäre Antikörper war ein Antirabbit IgG 1:5000. Die Belichtungszeit betrug 5 Minuten.

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde das vorangegangene Experiment wiederholt. Die Ergebnisse entsprechen denen des letzten Versuches, vollkommene Übereinstimmung ist aufgrund der vielfältigen Parametern in biologischen Systemen schwer zu erreichen.

Tabelle 21: Übersicht der benutzten Antikörper

MG	Inhibition : SASN 1 (1x10 ⁻⁵ M)	RAW 264,7 + rm-RANKL				RAW 264,7					
		C	1 min	15 min	60 min	120 min	C	1 min	15 min		120 min
60kD	Phospho AKT (163)	●	▲▲	-	▲	▲▲	●	▲	●	▲▲	1.Str
43kD	Phospho p38 MAPK (157)	●	●	-	-	●	●	▲▲	-	-	2.Str
43kD	p38 MAPK (156)	●	●	▼	▼	▲	●	●	●	●	3.Str
44kD	Phospho MAPK p42/p44 (127)	●	●	●	●	▲	●	●	●	●	1.Str
75kD	Phospho NF kB p65 (160)	●	●	●	●	▲	●	●	-	▲	2.Str
60kD	Phospho Src (154)	●	●	▲	●	●	●	●	●	●	3.Str.

5 DISKUSSION

Da verschiedenste Berichte zeigten, daß phenolische Strukturen wie Flavonoide und kondensierbare Gerbstoffe eine potente Inhibition der Osteoklastendifferenzierung und Funktion besitzen, (Park, et al., 2004) war es Ziel dieser Diplomarbeit, die beiden Ellagitannine Vescalagin und Roburin B hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Osteoklastenfunktion und Differenzierung zu inhibieren, genau zu untersuchen.

Diese polyphenolen Strukturen scheinen zusätzlich sowohl über antioxidative als auch antionkogene Eigenschaften zu verfügen. (Bravo, 1998)

Desweiteren haben zum Beispiel auch die Inhaltsstoffe der Sojabohne Genistein und Daidzein einen durchaus signifikanten Einfluss auf die Osteoklastendifferenzierung. (Yamagishi, et al., 2001) Den gleichen Effekt stellte man auch bei Flavonoiden, wie Quercetin, Kaempferol und Epigallocatechingallaten, welche der Gruppe der kondensierbaren Tannine angehören, fest. Letztere findet man in Gemüse, Wein und grünem Tee. Sie induzieren allesamt Apoptose in den reifen Osteoklasten und hemmen so die Knochenresorption. (Nakagawa, et al., 2002), (Wattel, et al., 2003)

Aufgrund zahlreicher Publikationen sind sie nun Objekt intensiver Forschungen, mit dem Ziel Arzneistoffe zur Prävention postmenopausaler Osteoporose zu entwickeln.

Als Modelle kamen eine Osteoblast Osteoklast Kokultur zum Einsatz, beziehungsweise Immunoblots ausgehend von murinen RAW264.7 Zellen mit verschiedenen Applikationszeiten der Testsubstanzen zur detaillierten Untersuchung der Wirkmechanismen.

Im Pitassay zeigte sich bei Roburin B im Konfidenzintervall 99,9% die Roburin B Konzentration von 5×10^{-5} Molar als sehr signifikant mit einer Resorptionsfläche von 0,12% gegenüber 3,3% in der Kontrollgruppe heraus. Das Intervall 99% zeigte die 1×10^{-5} Molare Roburin B Konzentration einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle. Hoch signifikanter Unterschied im Konfidenzintervall von 99,9% war bei der Roburin B Konzentration von 5×10^{-5} M, 3×10^{-5} M und 1×10^{-5} M im Vergleich zur Kontrollgruppe zu sehen.

Einen Vergleich mit Furosin, ein Ellagitannin, welches eine Galloylgruppe an Position 1 und eine Dehydrohexahydroxydiphenoylgruppe an Position 2 und 4 am Glukoserest besitzt, zu ziehen ist nur nach der Hemmung der Osteoklastenresorption möglich, da in dem Artikel die inhibierende Furosinzugabe im Stadium der Osteoklastendifferenzierung und bei mir später erfolgte. Eine Furosinzugabe von 10 $\mu\text{g/ml}$ bewirkte eine Hemmung der Osteoklastendifferenzierung im frühen Stadium, was durch ein stark reduziertes Signal der phosphorylierten p38 MAPK und JNK gezeigt wurde.

Da bei Furosin zusätzlich eine Desintegrierung der Aktinringe bzw. TRAP Expression beobachtet wurde, wäre bei Roburin B hinsichtlich dieses Aspektes Forschungsbedarf. (Park, et al., 2004)

Der Proliferationsassay mittels SDS-PAGE, Western Transfer und Immunoblot lieferte in 5 Tage alten RANKL stimulierten RAW 264.7 Zellen eine stimulierende Wirkung des phosphorylierten NF κ B Signals bereits nach 1 Minute, wobei die Signalstärke dann bei einer Roburin B Applikationszeit von 15 Minuten bis 2 Stunden noch einmal zunahm. Dies lässt darauf schließen, dass es zu einer Erhöhung der Differenzierungsrate der Osteoklasten kommt.

Zudem konnte ich eine leichte Abschwächung der Phosphorylierung in der Zeitspanne 15-120 min von p42/p44 MAPK feststellen. Dies deutet auf eine Hemmung in der Proliferationsphase mit verminderter Produktion von c-fos und Cyclin D in der Kaskade hin.

In einem Versuch von 2002 entdeckte man, dass die p38 MAPK sehr bedeutend für die Induktion der Osteoklastendifferenzierung, jedoch nicht für die Osteoklastenfunktion ist. (Li, et al., 2002)

Weiters kam es zu einer Signalverstärkung bei einer Minute und 5 Minuten bei der Detektion der phosphorylierten p38 MAPK, welche mit Roburin B und RANKL behandelt wurde. Dieses Signal wurde danach wieder schwächer und blieb auf dem Level der Kontrollgruppe. (siehe Tabelle 21)

Im zweiten Proliferationsassay testete ich das Ellagitannin Vescalagin. Das Signal des phosphorylierten AKT stieg nach einer Minute Vescalaginapplikation stark an und blieb auf diesem Niveau bis zur längsten Applikation von 2 Stunden. AKT wirkt in der Proliferationsphase und erhöht die Cyclin D und in weiterer Folge c-fos.

Keine Änderung des Signals im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte bei der phospho p42/p44 MAPK in meinen Experimenten verzeichnet werden. P42MAPK benötigt 2 Phosphorylierungen. Einmal am Threonin und einmal am Tyrosin um vollständige Aktivität zu erreichen. (Rossomando, et al., 1989), (Ray und Sturgill, 1988)

P42 und das sehr ähnliche p44MAPK gehören in die Familie der Serin-Threonin Kinasen, welche in Säugerzellen auch als ERK1(extracellular signal-regulated kinase 1) und ERK2 bekannt sind. Ihre enzymatische Aktivität korreliert mit der mitogenen Stimulation. (Pages, et al., 1993)

Bei P38 MAPK führte 15 Minuten und eine Stunde Vescalaginapplikation zu einer Signalabschwächung und nach 2 Stunden Substanzzugabe kam es zu einer leichten Signalverstärkung.

Ebenfalls nach 2 Stunden Applikation kam es in der RANKL Gruppe zu einer intensiveren Bande des phosphorylierten NF κ B. Die Rolle des phosphorylierten NF κ B ist bis dato noch nicht gut verstanden. Er spielt aber eine wichtige Rolle in der

Osteoklastenformation und Differenzierung. Ein bekannter Hemmer des NF κ B Weges ist das sogenannte NBD-Peptid. (Soysa, et al., 2009)

Die Src Kinase (SFKs), welche zu der Gruppe der nicht rezeptoralen Protein Tyrosin Kinasen gehört, besteht aus neun Untergruppen. Sie beeinflussen viele zelluläre Vorgänge, wie Adhäsion, Migration, Differenzierung bzw. Formation des Aktinringes und der Osteoklastenknochenresorption. Ausgehend davon wurde auf die Aktivität getestet. (Fizazi, 2007), (Soysa, et al., 2009)

Die letzte Detektion wurde mit phosphorylierten Src Antikörper durchgeführt, welcher eine wichtige Rolle bei Zelladhäsion in der Resorptionsphase spielen. Hier kam es nach 15 Minuten Vescalagingabe zu einer Signalverstärkung. (siehe Tabelle 24 und 25)

Da in den Zellen sowohl fertige Osteoklasten als auch Präosteklasten befanden kommt es teilweise zu transienten Schwankungen in der Signalstärke der Banden.

Die Experimente lassen jedoch den Schluss ziehen, dass Ellagitannine tatsächlich in späterer Zukunft als Wirkstoffe in der Osteoporoseprävention bzw. als Antioxidans und Antikarzinogen einsetzbar sein werden. In der Literatur findet man eine empfohlene tägl. Zufuhr von 6 mg Ellagsäure für die Niederlande. Ein Problem stellt sich allerdings und zwar wird die Ellagsäure im Darm nur in geringen Mengen resorbiert (Smart, et al., 1986) und mit einer Halbwertszeit von ca. 5 Minuten im Blut sehr schnell wieder ausgeschieden.

Diese Eigenschaften erfordern eine kontinuierliche Einnahme um therapeutisch wirksame Dosen über einen längeren Zeitraum zu erreichen. Eventuell denkbar wären retardierte galenische Zubereitungsformen.

Einige Resorptionsstudien sind aus dem Jahr 1992 bekannt, wobei hier aber hier mit reiner Ellagsäure getestet wurde, während sie in den Pflanzen jedoch als Glykosid bzw. Ester vorkommt und dadurch eine niedrigere Bioverfügbarkeit besitzt. Ein weiteres Problem ist, dass oral zugeführte Ellagsäure bevorzugt zur Lunge transportiert wird. Es wurden bis zu 10 fach höhere Konzentrationen als zum Beispiel in der Leber gemessen. (Boukharta, et al., 1992)

Ellagsäuredihydrat, chemisch 4,4',5,5',6,6'-Hexahydroxydiphenolsäure 2,6,2',6'-dilakton, ist seit 2003 als Nahrungsergänzungsmittel in Form von Kapseln bzw.

Pulver von Merck erhältlich, wobei aber noch keine Dosierungsempfehlungen angegeben sind. Ebenfalls fehlen hier Angaben über karzinogene, mutagene und teratogene Wirkung. (Biosciences)

6 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden die Substanzen Roburin B und Vescalagin hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Resorptionsfähigkeit bzw. Differenzierung von Osteoklasten getestet. Verwendet wurde einerseits ein Osteoblasten-Osteoklasten Resorptionsmodell (Pitassay) und andererseits Signaltransduktionsstudien zur Untersuchung bestimmter Proteinkinasen.

Gesäete Osteoblasten wurden mit Vitamin D₃ und PGE₂ versetzt. In weiterer Folge bildeten die OB RANKL, welcher die Differenzierung von Knochenmarkszellen in Osteoklasten einleitete. Nach drei Tagen erfolgte die Zugabe von Roburin B in unterschiedlichen Konzentrationen für 48 Stunden. Aus den Ergebnissen konnte man ableiten dass die Konzentrationen 5×10^{-5} , 1×10^{-5} und 5×10^{-6} die Resorptionsfähigkeit von Osteoklasten signifikant senken können.

Für die Signaltransduktionsstudien wurden mithilfe von RANKL Osteoklasten aus RAW 264.7 Zellen erzeugt. Durch Zellyse, Gelelektrophorese und Western Transfer wurden intrazelluläre Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Phospho P42/P44 MAPK wurde von Roburin B nach 15 min bis 2 Stunden leicht inhibiert, was eine Hemmung der Proliferationsphase bedeutet. Weiters kam es zu vermehrter Aktivität von phospho NFκB welche die Osteoklastendifferenzierung kurzzeitig anregt und eine transiente Signalverstärkung bei phospho P38 MAPK in der Applikationsdauer 1-5 min was einen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit bzw. Zelldifferenzierung vermuten lässt.

Vescalagin lieferte bei phospho AKT eine Signalverstärkung nach einer Minute, 60 und 120 Minuten und erhöhte somit die Zellproliferationsphase. P38 MAPK wurde nach 15 Minuten und 60 Minuten abgeschwächt. Intensivere Banden waren auch im

Phospho P42/P44 MAPK nach 120 Minuten und im phospho NFkB zu sehen. Das Signal von phospho Src war transient und wurde nach 15 leicht intensiver.

Dieses Signal spielt eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion der Osteoklasten an der Knochenoberfläche.

7 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mir beim Erstellen dieser Arbeit durch ihre Unterstützung zur Seite gestanden sind.

Allen voran Prof. Dr. Oskar Hoffmann, Begutachter und Betreuer dieser Arbeit, sowie bei Frau Berger und Herrn Höflich, die mir durch ihre intensive Betreuung, zum einem im wissenschaftlichen Bereich zum anderen im technischen Bereich, sehr geholfen haben.

Meiner Freundin Johanna danke ich für Ausdauer und Geduld.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern Anita und Wolfgang, die mein Studium erst ermöglicht haben, mich all die Jahre hinweg tatkräftig unterstützt haben und meinen Plänen und Wünschen gegenüber immer offen waren.

8 CURRICULUM VITAE

Name: Daniel Danninger

Geburtsdatum: 07.02.1979

Geburtsort: Schärding

Staatsbürgerschaft: österreichische

Eltern: Anita Danninger, Volksschullehrerin

HR Dipl.Ing. Wolfgang Danninger, OÖ-
Landesregierung (Dorferneuerung)

Geschwister: Verena

Schulausbildung:

1985 – 1989 Volksschule Kopfing im Innkreis

1989 – 1997 Bundesrealgymnasium Schärding

1998 – 1999 TU - Wien, Elektrotechnik

1999 Umstieg auf Universität Wien, Pharmazie

2007 Beginn der Diplomarbeit am Institut für
Pharmakologie und Toxikologie, Betreuer Prof. Dr. Oskar
Hoffmann

Grundwehrdienst: Mariatheresienkaserne, 1. Gardekompanie,
Wien (Jänner - August 1998)

Bisherige Tätigkeiten:

2001 Riedbergapotheke, Ried im Innkreis

2001 Sony Wien, Promotion - Teilzeit in verschiedenen
Elektronikmärkten

seit 2002 Mediamarkt Wien - Hietzing, Teilzeitkraft
Abteilung Computer Hardware

2008 Leonhardusapotheke, Wien

9 **ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1: Röhrenknochen	8
Abbildung 2: Regulation der Osteoklastenaktivität	15
Abbildung 3: alkalische Phosphatase	22
Abbildung 4: OPG/RANKL System	28
Abbildung 5: Wirkungsweise von Osteoprotegerin	29
Abbildung 6: Prinzip der Signalübertragung durch intrazelluläre Proteinkinase Kaskaden.....	32
Abbildung 7: MAPK/ERK Signalweg	36
Abbildung 8: PKB Signalweg.....	41
Abbildung 9: Roburin B	46
Abbildung 10: Vescalagin	46
Abbildung 11: Balb/c	61
Abbildung 12: Toluidinblau.....	64
Abbildung 13: Beispiel einer „Osteoklastenfrassspur“	65
Abbildung 14: Polymerisationsreaktion	71
Abbildung 15: Gelelektrophoresekammer.....	72
Abbildung 17: Schritte im Western Transfer	75
Abbildung 18: Aufbau eines Western Blots	76
Abbildung 19: Ponceau-Rot.....	77
Abbildung 20: Schematische Darstellung der Immunodetektion	79
Abbildung 21: Grafische Auswertung	81
Abbildung 22: Grafische Auswertung der Resorptionsflächen unter verschiedenen SASN6 Konzentrationen	83
Abbildung 23: Grafische Auswertung der Resorptionsflächen unter verschiedenen SASN6 Konzentrationen	86
Abbildung 24: phospho MAPK p42/p44.....	88
Abbildung 25: phospho NF kappa B	89
Abbildung 26: anti beta Aktin.....	90
Abbildung 27: phospho p38 MAPK.....	91
Abbildung 28: Anti beta Aktin.....	92
Abbildung 29: phospho AKT.....	94
Abbildung 30: phospho AKT.....	95
Abbildung 31: phospho p38 MAPK.....	96
Abbildung 32: p38 MAPK.....	97
Abbildung 33: p42/p44 MAPK.....	98
Abbildung 34: phospho NF kappa B	99
Abbildung 35: phospho Src	100

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Liste der verwendeten Abkürzungen	6
Tabelle 2: Wirkungen von PTH und Calcitriol	11
Tabelle 3: verwendete Laborgeräte	47
Tabelle 4: phospho p-38 MAP Kinase	56
Tabelle 5: phospho AKT	56
Tabelle 6: Anti Beta Aktin	57
Tabelle 7: AKT	57
Tabelle 8: phospho NF- κ B	58
Tabelle 9: phospho MAP Kinase P42/P44	58
Tabelle 10: p-38 MAP Kinase	58
Tabelle 11: phospho-Src	59
Tabelle 12: phospho AKT	59
Tabelle 13: Anti-Rabbit IgG HRP Konjugat	60
Tabelle 14: Anti-Mouse IgG HRP Konjugat	60
Tabelle 15: Schema der Inhibitionszeiten (4x 6er Wellplatten)	66
Tabelle 16: Ermittlung der Proteinkonzentration für die Gelelektrophorese mittels Proteinassay und ELISA Reader	69
Tabelle 17: Versuchsanordnung auf der Well Platte	80
Tabelle 18: Resorptionsflächen der einzelnen Knochenplättchen	82
Tabelle 19: Resorptionsflächen der einzelnen Knochenplättchen	84
Tabelle 20: Übersicht der benutzen Antikörper	92
Tabelle 21: Übersicht der benutzten Antikörper	101

11 LITERATURVERZEICHNIS

Avruch, J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, Zhang XF
2001 Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the
MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* **56**:127-55.

Bargmann, CI 1998 Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science*
282(5396):2028-33.

Bellacosa, A, Testa JR, Moore R, Larue L 2004 A portrait of AKT kinases: human
cancer and animal models depict a family with strong individualities. *Cancer
Biol Ther* **3**(3):268-75.

Bellido, T, Jilka RL, Boyce BF, Girasole G, Broxmeyer H, Dalrymple SA, Murray
R, Manolagas SC 1995 Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and

- bone mass by androgens. The role of the androgen receptor. *J Clin Invest* **95**(6):2886-95.
- Biosciences, M Sicherheitsdatenblatt. (Ellagsäure).
- Boguski, MS, McCormick F 1993 Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **366**(6456):643-54.
- Boukharta, M, Jalbert G, Castonguay A 1992 Biodistribution of ellagic acid and dose-related inhibition of lung tumorigenesis in A/J mice. *Nutr Cancer* **18**(2):181-9.
- Boyle, WJ, Simonet WS, Lacey DL 2003 Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423**(6937):337-42.
- Bravo, L 1998 Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* **56**(11):317-33.
- Burgering, BM, Bos JL 1995 Regulation of Ras-mediated signalling: more than one way to skin a cat. *Trends Biochem Sci* **20**(1):18-22.
- Cadahia, E, Varea S, Munoz L, Fernandez De Simon B, Garcia-Vallejo MC 2001 Evolution of ellagitannins in Spanish, French, and American oak woods during natural seasoning and toasting. *J Agric Food Chem* **49**(8):3677-84.
- Cerda, B, Periago P, Espin JC, Tomas-Barberan FA 2005 Identification of urolithin a as a metabolite produced by human colon microflora from ellagic acid and related compounds. *J Agric Food Chem* **53**(14):5571-6.
- Chang, L, Karin M 2001 Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**(6824):37-40.
- Chaudhary, LR, Avioli LV 1997 Activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1 and ERK2) by FGF-2 and PDGF-BB in normal human osteoblastic and bone marrow stromal cells: differences in mobility and in-gel renaturation of ERK1 in human, rat, and mouse osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* **238**(1):134-9.
- Chen, G, Hitomi M, Han J, Stacey DW 2000 The p38 pathway provides negative feedback for Ras proliferative signaling. *J Biol Chem* **275**(50):38973-80.

- Chen, W, White MA, Cobb MH 2002 Stimulus-specific requirements for MAP3 kinases in activating the JNK pathway. *J Biol Chem* **277**(51):49105-10.
- Collin-Osdoby, P, Yu X, Zheng H, Osdoby P 2003 RANKL-mediated osteoclast formation from murine RAW 264.7 cells. *Methods Mol Med* **80**:153-66.
- Cunnick, JM, Dorsey JF, Standley T, Turkson J, Kraker AJ, Fry DW, Jove R, Wu J 1998 Role of tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor in the lysophosphatidic acid-stimulated mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* **273**(23):14468-75.
- Daub, H, Wallasch C, Lankenau A, Herrlich A, Ullrich A 1997 Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *Embo J* **16**(23):7032-44.
- Daub, H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A 1996 Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* **379**(6565):557-60.
- David, JP, Sabapathy K, Hoffmann O, Idarraga MH, Wagner EF 2002 JNK1 modulates osteoclastogenesis through both c-Jun phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Cell Sci* **115**(Pt 22):4317-25.
- Dimai, HP 2007 Protelos® - neue Studiendaten. 15. Österreichisches Osteoporoseforum, Graz
- Fahrleitner, P, A. 2007 Raloxifen (Evista(R)) - Ein Molekül mit vielen Aspekten. *Journal für Mineralstoffwechsel* **14** (1):39-44.
- Fizazi, K 2007 The role of Src in prostate cancer. *Ann Oncol* **18**(11):1765-73.
- Girasole, GJ, R. L. Passeri, G. Boswell, S. Boder, G. Williams, D. C. 1992 17-Estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow derived stromal cells and osteoblasts in vitro: A potential mechanism for the anti-osteoporotic effect of estrogens. *THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION* **89**:883-891.
- Glabasnia, A, Hofmann T 2006 Sensory-directed identification of taste-active ellagitannins in American (*Quercus alba* L.) and European oak wood

- (*Quercus robur* L.) and quantitative analysis in bourbon whiskey and oak-matured red wines. *J Agric Food Chem* **54**(9):3380-90.
- Hipskind, RA, Bilbe G 1998 MAP kinase signaling cascades and gene expression in osteoblasts. *Front Biosci* **3**:d804-16.
- Hirono, I 1987 *Bioactive Molecules - volume 2 - Naturally Occurring Carcinogens of Plant Origin*. Elsevier **2**:161-166.
- Hofbauer, LC 2004 Die Rolle von RANK-Ligand und Osteoprotegerin bei Osteoporose. *Journal für Mineralstoffwechsel* **11 (Sonderheft 2)**:15-19.
- Holick, MF 2007 Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* **357**(3):266-81.
- Hordijk, PL, Verlaan I, van Corven EJ, Moolenaar WH 1994 Protein tyrosine phosphorylation induced by lysophosphatidic acid in Rat-1 fibroblasts. Evidence that phosphorylation of map kinase is mediated by the Gi-p21ras pathway. *J Biol Chem* **269**(1):645-51.
- Johnson, GL, Lapadat R 2002 Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**(5600):1911-2.
- Karsenty, G 2007 Research Shows Skeleton to be Endocrine Organ. *Columbia University News*.
- Koebke, JS, H.; Wevers, A. 2005 *Internetatlas der Anatomie des Menschen*. Universität Köln, Köln. <http://www.anatomiedesmenschen.de/netscape/mikro/knochen/roehrenknochen/roehrenknochen.htm>-Internetatlas
- Kopsch, R 2003 *Anatomie des Menschen, Band 1, Bewegungsapparat*, 3 ed. Thieme, Stuttgart
- Krampla, WN, S. Huber, K. Hawa, G. Posch, M. Fendt, S. Katschnig, I. Kröner, A. Hayden, E. Kittl, E. Eyb, R. Hruby, W. 2007 Osteoprotegerin - ein neuer Laborparameter zur Unterstützung der radiologischen Diagnostik rezenter Frakturen? . *Journal für Mineralstoffwechsel* **14 (2)**:61-67.

- Kranenburg, O, Verlaan I, Hordijk PL, Moolenaar WH 1997 Gi-mediated activation of the Ras/MAP kinase pathway involves a 100 kDa tyrosine-phosphorylated Grb2 SH3 binding protein, but not Src nor Shc. *Embo J* **16**(11):3097-105.
- Kuo, PL, Hsu YL, Lin TC, Tzeng WS, Chen YY, Lin CC 2007 Rugosin E, an ellagitannin, inhibits MDA-MB-231 human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis by inhibiting nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Cancer Lett* **248**(2):280-91.
- Kurihara, N, Chenu C, Miller M, Civin C, Roodman GD 1990 Identification of committed mononuclear precursors for osteoclast-like cells formed in long term human marrow cultures. *Endocrinology* **126**(5):2733-41.
- Lee, WKM, Kim S.Y., Kwack K., Lee Z.H., Kim H.H. 2002 The phosphatidylinositol 3-kinase, p38, and extracellular signal regulated kinase pathways are involved in osteoclast differentiation. *Bone* **30**:71-77.
- Li, X, Udagawa N, Itoh K, Suda K, Murase Y, Nishihara T, Suda T, Takahashi N 2002 p38 MAPK-mediated signals are required for inducing osteoclast differentiation but not for osteoclast function. *Endocrinology* **143**(8):3105-13.
- Linseman, DA, Benjamin CW, Jones DA 1995 Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **270**(21):12563-8.
- Luttrell, LM, Della Rocca GJ, van Biesen T, Luttrell DK, Lefkowitz RJ 1997 Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J Biol Chem* **272**(7):4637-44.
- Moolenaar, WH 1991 G-protein-coupled receptors, phosphoinositide hydrolysis, and cell proliferation. *Cell Growth Differ* **2**(7):359-64.
- Moolenaar, WH, Kranenburg O, Postma FR, Zondag GC 1997 Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. *Curr Opin Cell Biol* **9**(2):168-73.
- Morrison, DK, Heidecker G, Rapp UR, Copeland TD 1993 Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. *J Biol Chem* **268**(23):17309-16.

- Mullen, W, Stewart AJ, Lean ME, Gardner P, Duthie GG, Crozier A 2002 Effect of freezing and storage on the phenolics, ellagitannins, flavonoids, and antioxidant capacity of red raspberries. *J Agric Food Chem* **50**(18):5197-201.
- Murphy, LO, Blenis J 2006 MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci* **31**(5):268-75.
- Mutschler 2001, 8. Auflage Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie. Wissenschaftliche
- Nakagawa, H, Wachi M, Woo JT, Kato M, Kasai S, Takahashi F, Lee IS, Nagai K 2002 Fenton reaction is primarily involved in a mechanism of (-)-epigallocatechin-3-gallate to induce osteoclastic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* **292**(1):94-101.
- Neumeister, Besenthal, Liebrich 2003 *Klinikleitfaden Labordiagnostik*. Urban&Fischer
- Orton, RJ, Sturm OE, Vyshemirsky V, Calder M, Gilbert DR, Kolch W 2005 Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. *Biochem J* **392**(Pt 2):249-61.
- Pages, G, Lenormand P, L'Allemain G, Chambard JC, Meloche S, Pouyssegur J 1993 Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(18):8319-23.
- Park, EK, Kim MS, Lee SH, Kim KH, Park JY, Kim TH, Lee IS, Woo JT, Jung JC, Shin HI, Choi JY, Kim SY 2004 Furosin, an ellagitannin, suppresses RANKL-induced osteoclast differentiation and function through inhibition of MAP kinase activation and actin ring formation. *Biochem Biophys Res Commun* **325**(4):1472-80.
- Paul, A, Wilson S, Belham CM, Robinson CJ, Scott PH, Gould GW, Plevin R 1997 Stress-activated protein kinases: activation, regulation and function. *Cell Signal* **9**(6):403-10.
- Pearson, Robinson F., Beers Gibson T., Xu B. E., Karandikar M., Berman K., Cobb M. H. 2001 Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**(2):153-83.

- Pouyssegur, J, Lenormand P 2003 Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Eur J Biochem* **270**(16):3291-9.
- Preisinger 2007 RANK/RANK-Ligand/OPG: Ein neuer Therapieansatz in der Osteoporosebehandlung. *Journal für Mineralstoffwechsel* **14**(4):144-145.
- Quideau, S 2007 CNRS Young Researchers Team. <http://www.sasn.u-bordeaux1.fr/SASN/products.html>
- Ray, LB, Sturgill TW 1988 Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(11):3753-7.
- Renz-Polster, H, Krautzig S, Braun J 2008 *Basislehrbuch innere Medizin*. Elsevier Urban und Fischer, pp 1376
- Resch, H 2004 Neues aus der Osteoporose-Therapie *Journal für Menopause* **11** (3) (**Ausgabe für Österreich**) 25-29.
- Rhee, SG, Bae YS 1997 Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem* **272**(24):15045-8.
- Rosen, CJ 2003 Restoring aging bones. *Sci Am* **288**(3):70-7.
- Rossomando, AJ, Payne DM, Weber MJ, Sturgill TW 1989 Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(18):6940-3.
- Scalbert, E 1991 Antimicrobial properties of tannins. *Elsevier Science* **30**(12):3875-3883.
- Schaenzler, NB, W.P. 2000 *Der Grosse GU Kompass Laborwerte*. Gräfe und Unzer
- Schnabel, DH, D. 2005 [Rickets. Diagnosis and therapy]. *Orthopade* **34**(7):703-14; quiz 715-6.

- Scholz, E, Rimpler H 1989 Proanthocyanidins from *Krameria triandra* root. *Planta Med* **55**(4):379-84.
- Schulze, WX, Deng L, Mann M 2005 Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol Syst Biol* **1**:2005 0008.
- Seger, R, Ahn NG, Boulton TG, Yancopoulos GD, Panayotatos N, Radziejewska E, Ericsson L, Bratlien RL, Cobb MH, Krebs EG 1991 Microtubule-associated protein 2 kinases, ERK1 and ERK2, undergo autophosphorylation on both tyrosine and threonine residues: implications for their mechanism of activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(14):6142-6.
- Seger, R, Krebs EG 1995 The MAPK signaling cascade. *Faseb J* **9**(9):726-35.
- Seifert, M 2003 Raloxifen. *Journal für Menopause* **10**(3):26-30.
- Shevde, NK, Bendixen AC, Dienger KM, Pike JW 2000 Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(14):7829-34.
- Simonds, WF 1999 G protein regulation of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol Sci* **20**(2):66-73.
- Smart, RC, Huang MT, Chang RL, Sayer JM, Jerina DM, Conney AH 1986 Disposition of the naturally occurring antimutagenic plant phenol, ellagic acid, and its synthetic derivatives, 3-O-decylellagic acid and 3,3'-di-O-methylellagic acid in mice. *Carcinogenesis* **7**(10):1663-7.
- Soyas, NS, Alles N, Shimokawa H, Jimi E, Aoki K, Ohya K 2009 Inhibition of the classical NF-kappaB pathway prevents osteoclast bone-resorbing activity. *J Bone Miner Metab* **27**(2):131-9.
- Sunahara, RK, Dessauer CW, Gilman AG 1996 Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**:461-80.
- Taussig, R, Gilman AG 1995 Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. *J Biol Chem* **270**(1):1-4.

- Teel, RW, Martin RM 1988 Disposition of the plant phenol ellagic acid in the mouse following oral administration by gavage. *Xenobiotica* **18**(4):397-405.
- Teitelbaum, SR, F. 2003 Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* **4**(8):638-49.
- Toker, A, Yoeli-Lerner M 2006 Akt signaling and cancer: surviving but not moving on. *Cancer Res* **66**(8):3963-6.
- Tondravi, MM, McKercher SR, Anderson K, Erdmann JM, Quiroz M, Maki R, Teitelbaum SL 1997 Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1. *Nature* **386**(6620):81-4.
- Tsukii, K, Shima N, Mochizuki S, Yamaguchi K, Kinosaki M, Yano K, Shibata O, Udagawa N, Yasuda H, Suda T, Higashio K 1998 Osteoclast differentiation factor mediates an essential signal for bone resorption induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃, prostaglandin E₂, or parathyroid hormone in the microenvironment of bone. *Biochem Biophys Res Commun* **246**(2):337-41.
- Uchiumi, F, Hatano T, Ito H, Yoshida T, Tanuma S 2003 Transcriptional suppression of the HIV promoter by natural compounds. *Antiviral Res* **58**(1):89-98.
- Waetzig, V, Herdegen T 2005 Context-specific inhibition of JNKs: overcoming the dilemma of protection and damage. *Trends Pharmacol Sci* **26**(9):455-61.
- Wang, XZ, Ron D 1996 Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science* **272**(5266):1347-9.
- Wattel, A, Kamel S, Mentaverri R, Lorget F, Prouillet C, Petit JP, Fardelonne P, Brazier M 2003 Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kaempferol on in vitro osteoclastic bone resorption. *Biochem Pharmacol* **65**(1):35-42.
- Wilkie, TM, Gilbert DJ, Olsen AS, Chen XN, Amatruda TT, Korenberg JR, Trask BJ, de Jong P, Reed RR, Simon MI, et al. 1992 Evolution of the mammalian G protein alpha subunit multigene family. *Nat Genet* **1**(2):85-91.
- Yamagishi, T, Otsuka E, Hagiwara H 2001 Reciprocal control of expression of mRNAs for osteoclast differentiation factor and OPG in osteogenic stromal

cells by genistein: evidence for the involvement of topoisomerase II in osteoclastogenesis. *Endocrinology* **142**(8):3632-7.

Yarden, Y, Escobedo JA, Kuang WJ, Yang-Feng TL, Daniel TO, Tremble PM, Chen EY, Ando ME, Harkins RN, Francke U, et al. 1986 Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. *Nature* **323**(6085):226-32.

Zarich, N, Oliva JL, Martinez N, Jorge R, Ballester A, Gutierrez-Eisman S, Garcia-Vargas S, Rojas JM 2006 Grb2 is a negative modulator of the intrinsic Ras-GEF activity of hSos1. *Mol Biol Cell* **17**(8):3591-7.