



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Einfluss von Melatonin auf das Wachstum von
Osteoklasten: Untersuchungen mittels eines neuen
automatisierten Imageanalysesystems“

Verfasserin

Kathrin Burger

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, Jänner 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreuer: Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Walter Jäger

Danksagung

Allem Voran gilt mein Dank meinem Betreuer Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Walter Jäger, dass er mir das Arbeiten an dieser Diplomarbeit ermöglicht hat.

Weiters will ich mich bei Frau Ao. Univ.-Prof. Dr. Theresia Thalhammer recht herzlich für die gute und liebevolle Betreuung meiner Arbeit am Institut für Pathophysiologie des Allgemeinen Krankenhauses Wien bedanken, sowie bei Isabella Ellinger, die mir die Mitarbeit an dem Projekt ermöglicht hat.

Ein besonderer Dank gilt Mag. Martin Schepelmann für die Einführung in die Arbeitstechniken, der Betreuung meiner Arbeit, sowie für seine Ratschläge beim Verfassen dieser Diplomarbeit. Martin hatte stets ein offenes Ohr für meine Anliegen und stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite.

Ing. Andreas Heindl will ich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung meinen Dank aussprechen.

Weiters möchte ich mich auf diesem Wege bei meinen Eltern bedanken, die mir während meines gesamten Studiums beigestanden und mich unterstützt haben.

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG / ABSTRACT	1
2. EINLEITUNG	5
2.1 Physiologie und Pathophysiologie der Knochen	5
2.1.1 Knochenaufbau.....	5
2.1.2 Funktion des Knochens	5
2.2 Osteoklasten	6
2.2.1 Differenzierung	7
2.2.2 Funktionsweise	8
2.3 Osteoklasten-assoziierte Erkrankungen.....	9
2.3.1 Osteoporose bzw. Osteopenie.....	10
2.3.2 Morbus Paget	13
2.3.3 Riesenzelltumor	13
2.4 Melatonin.....	14
2.4.1 Allgemeine Informationen	14
2.4.2 Biosynthese	15
2.4.3 Metabolismus.....	17
2.4.4 Melatonin-Rezeptoren	18
2.4.5 Funktionen und Anwendung	20
2.5 Einfluss von Melatonin auf den Knochen	21
2.5.1 Melatonin und Knochenkrankheiten.....	23
3. ZIELE	25
4. MATERIAL UND METHODEN	27
4.1 Gewinnung von OC-Vorläuferzellen aus Maus-Knochenmark	27
4.1.1 Präparieren der großen Röhrenknochen	27
4.1.2 Ausspülen des Knochenmarks	28
4.2 Anlegen einer OC-Zellkultur	28
4.2.1 Vorbereitung	28
4.2.2 Durchführung	31
4.2.3 Wechseln des Mediums	31
4.3 RNA-Isolierung aus Maus-OC	32
4.3.1 Prinzip.....	32
4.3.2 Durchführung	33

4.4	Bestimmung der Menge und Reinheit der isolierten RNA	35
4.5	Agarose Gel-Elektrophorese (GE)	35
4.5.1	Herstellung von Puffer und Lösungen.....	36
4.5.2	Herstellung des Agarose-Gels	37
4.5.3	Gel-Elektrophorese (GE)	38
4.6	Reverse Transkription der isolierten RNA	39
4.6.1	Prinzip.....	39
4.6.2	Durchführung	39
4.7	PCR – Polymerase Ketten Reaktion	42
4.7.1	Prinzip.....	42
4.7.2	Durchführung	43
4.8	Real time PCR (qPCR).....	45
4.8.1	Prinzip.....	45
4.8.2	Durchführung	47
4.9	Immunfluoreszenzfärbung.....	48
4.9.1	Prinzip.....	48
4.9.2	Vorbereitung	50
4.9.3	Färbung	51
4.9.4	Fluoreszenzmikroskopie	54
4.10	Tartrat-resistente saure Phosphatase-Färbung	54
4.10.1	Prinzip.....	54
4.10.2	Vorbereitung	54
4.10.3	Färbung	55
5.	ERGEBNISSE.....	57
5.1	Optimierung einer OC-Zellkultur.....	57
5.2	TRAP-Färbung zur Quantifizierung von Osteoklasten.....	58
5.3	Immunfluoreszenzfärbungen zur OC erkenntnis.....	64
5.4.	Nachweis des MT ₁ Rezeptors mittels RT-PCR	68
6.	DISKUSSION.....	71
7.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	75
8.	TABELLENVERZEICHNIS	76
9.	ABKÜRZUNGEN	77
10.	LITERATURANGABEN.....	80
11.	LEBENS LAUF	85

1. Zusammenfassung

Die Aktivität der Knochen-aufbauenden Osteoblasten und der Knochen-abbauenden Osteoklasten bewirkt einen kontinuierlichen Knochenumbau. Dies ist nicht nur wichtig, um den Knochen funktionsfähig zu erhalten sondern trägt auch dazu bei, den Calciumhaushalt auszugleichen. In dieser Arbeit wurde die Bildung von Osteoklasten untersucht. Osteoklasten sind mehrkernige Zellen, welche sich über Vorläuferzellen durch die Wirkung von RANKL und M-CSF aus hämatopoietischen Stammzellen bilden. Zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen Knochenauf- und -abbau spielt das RANK / RANKL / OPG-System eine entscheidende Rolle. Ist dieses Gleichgewicht gestört, und überwiegt die Zahl an knochenabbauenden Osteoklasten, kann es zu Krankheiten wie der Osteoporose kommen. Sie spielen auch bei den osteoklastischen Metastasen eine wichtige Rolle.

In vitro und in vivo Untersuchungen zeigten, dass das Hormon Melatonin, synthetisiert aus der Aminosäure Tryptophan, eine hemmende Wirkung auf den Knochenabbau ausübt. Es wird vorwiegend in der Zirbeldrüse, aber auch in der Retina, dem Knochenmark und anderen Organen gebildet. Die Serumkonzentration von Melatonin unterliegt tageszeitlichen Schwankungen, wobei diese bei Dunkelheit 10-100-fach erhöht ist. Seine Wirkungen entfaltet Melatonin über verschiedene Rezeptoren. MT₁ und MT₂ sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren und kommen in Säugetieren vor, wohingegen MT₃ bei Nagetieren entdeckt wurde und oxidoreduktive Eigenschaften aufweist. Zahlreiche physiologische Funktionen unterliegen dem Einfluss von Melatonin. Durch seine tageszeitlichen Schwankungen reguliert es verschiedene Körperfunktionen, wie z.B. Schlaf, Appetit, Körpergewicht, Körpertemperatur etc. Abgesehen von seinen Rezeptor-vermittelten Effekten, wirkt Melatonin auch als Antioxidans. Es neutralisiert nicht nur eine Vielzahl an freien Radikalen, sondern steuert auch eine Reihe antioxidativ wirkender Enzyme. Mit steigendem Alter sinkt die Konzentration an Melatonin, wodurch ein Zusammenhang zwischen Melatonin und altersbedingten Krankheiten, z.B. Osteoporose, vermutet wird. Da hohe Melatonin-Konzentrationen im Knochenmark zu finden sind und der Knochen einem 24-Stunden-Rhythmus unterliegt, kann von einem Einfluss von Melatonin auf die Knochenzellen ausgegangen werden.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Melatonin auf die Osteoklastenbildung aus Knochenmarkszellen der Maus mittels Immunfluoreszenzfärbung der Osteoklasten und anschließender Analyse mithilfe einer TissueFAXS / TissueQuest Software untersucht. Als Kontrolle wurde die klassische Methode zur Erkennung und Quantifizierung von Osteoklasten mittels TRAP-Färbung verwendet, die allerdings sehr ungenaue Ergebnisse liefert, und keine Bestimmung aller Zellen in der Kultur zulässt. Weiters erlaubt diese Methode keine nachfolgende Untersuchung der identifizierten Osteoklasten mittels weiterer Immunfluoreszenz- bzw. Immunhistochemieuntersuchungen. Hier bringt die Automatisierung der Analyse der mikroskopischen Bilder absolute Vorteile und konnte nun auch für mehrkernige Zellen, wie Osteoklasten, etabliert werden.

Melatonin-Konzentrationen, ausgehend von therapeutischen (μM) bis hin zu physiologischen (nM) Konzentration, wurden in den Studien verwendet. Es wurde eine automatische Analyse-Software zur Auszählung von Osteoklasten in einer Zellkultur entwickelt. Nach Immunfluoreszenzfärbung konnte mithilfe der Software nicht nur die Anzahl der Osteoklasten in der Kultur, sondern auch deren Fläche sowie das Verhältnis von Osteoklasten zu Osteoklastenvorläuferzellen bestimmt werden. Weiters wurden die Zellen auch für den Nachweis des Melatoninrezeptors untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine Abnahme der Zellzahl, sowie der Zellfläche bei physiologischen Konzentrationen im Vergleich zu pharmakologischen Melatoninindosen.

Im nächsten Schritt wurde mithilfe der Immunfluoreszenz-Färbung das Vorkommen und die Lokalisation des Melatonin-Rezeptors MT_1 in Osteoklasten und Präosteoklasten nachgewiesen. Auch auf mRNA Ebene wurde mittels RT-PCR unter Anwendung von TaqMan-Sonden das Vorkommen von MT_1 nicht aber von MT_2 bestätigt. In Anwesenheit von Melatonin scheint die Expressionsrate des Rezeptors abzunehmen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine neue Analysen-Software zur automatischen Detektion von mehrkernigen Zellen wie den Osteoklasten erfolgreich angewendet und evaluiert wurde. Mithilfe dieser Methode konnte eine Abnahme sowohl der Osteoklasten-Zahl als auch der –Fläche in Anwesenheit von Melatonin festgestellt werden.

Abstract

Bone-forming osteoblasts and bone-degrading osteoclasts work together to maintain the homeostasis of bone turnover. Furthermore, they are important for the reconstruction of damaged bone regions and the compensation of variations in the calcium balance of the body.

In this diploma thesis the formation of osteoclasts has been investigated. Osteoclasts are large bone-resorbing cells, which contain more than 3 nuclei and the enzyme tartrate-resistant alkaline phosphatase (TRAP). They are formed by the fusion of cells from the monocyte-macrophage line of precursor cells. Osteoclast formation requires the presence of RANK ligand (RANKL) and M-CSF. To maintain the balance between bone formation and bone resorption, the RANK / RANKL / OPG system is playing a decisive role. Any disturbance of this balance leads to bone disease, such as osteoporosis, which is quite frequently observed, particularly, in elderly women. Therefore, compounds, which can inhibit bone resorption are of great pharmacological interest.

In vitro and *in vivo* studies showed that melatonin, a derivative of the amino acid tryptophan, inhibits bone resorption. It is mainly synthesized by the pineal gland. However, it is also produced extrapineally, e.g. by bone marrow cells, and endocrine cells in the intestine and other organs. Pineal melatonin secretion is subjected to a circadian rhythm and its production is inhibited by light and stimulated by darkness. Melatonin exerts its effects through various receptors. MT₁ and MT₂ are G-protein coupled receptors in mammals, while MT₃ was discovered in rodents and its stimulation may induce antioxidative effects. Melatonin is responsible for many biological effects. It is part of the system that regulates the sleep-wake cycle. Other established effects of melatonin are for example its activity as antioxidant or its interaction with the immune system. Melatonin not only neutralises a variety of free radicals but also induces antioxidative enzymes. In humans, during aging, the concentration of melatonin decreases and this might lead to an increase in the concentration of free radicals leading to cell damage. Melatonin production is highest in adolescents during the bone growth and skeletal development suggesting that it may have an influence on skeletal growth and bone formation. Additionally, bone metabolism underlies a circadian rhythm, which might also be influenced by pineal melatonin secretion.

To study these processes, the influence of melatonin on osteoclast formation was investigated. Osteoclasts were generated from mouse bone marrow cells and immunofluorescence staining of osteoclast markers were done to identify and quantify these cells in an automated microscopic analysis.

Up to now OC were detected in culture using a histochemical method of TRAP staining. The disadvantage of this method is that osteoclasts and its precursor cells have to be counted manually under the microscope. With this manual method, the cell number varies to a great degree not only in between the regions on the microscopic preparation, but also in between the human experts. Furthermore, no further analysis of potential target on the identified osteoclast is possible.

To overcome these problems an automated quantification system was developed. After immunofluorescence staining of targets like the calcitonin receptor and tubulin on the cells, the cell preparations were subjected to a newly developed automated quantification system. Cell numbers as well as cell areas of all cells, osteoclasts and non-osteoclasts were quantified. The cell number showed a significant reduction of osteoclast formation at physiological (nM) melatonin levels compared to pharmacological levels of the hormone (μ M). This was also seen for the area of cells.

Different concentrations of melatonin also had an influence on the mRNA expression of melatonin receptors. MT_1 , which is only poorly expressed on these cells showed a tendency to decrease in the presence of melatonin. This suggests a correlation between the expression of MT_1 and melatonin levels. No expression of MT_2 was detectable.

In the summary, the new automatic quantification system for the detection and area determination of osteoclasts in culture proved to be successful and led to the conclusion that the number and area of osteoclasts is reduced in the presence of melatonin.

2. EINLEITUNG

2.1 Physiologie und Pathophysiologie der Knochen

2.1.1 Knochenaufbau

Knochen bestehen zu einem großen Teil aus Verstrebungen, den Trabekeln mit den dazwischen liegenden Hohlräumen, sowie einer extrazellulären Matrix. Diese setzt sich zu zwei Dritteln aus Calciumhydroxylapatit und zu einem Drittel aus organischen Substanzen zusammen. Zu den organischen Substanzen zählen hauptsächlich Typ-1-Kollagen und unterschiedliche Proteine, z.B. Proteoglykane und Calcium-bindende Proteine, die vor allem durch Osteoblasten (siehe Kapitel 2.2.1) synthetisiert werden. Über verschiedene Cytokine und Wachstumsfaktoren (siehe Kapitel 2.2.1), welche sich ebenfalls in der Matrix befinden, werden die Differenzierung und Funktionen der Knochenzellen gesteuert [1].

2.1.2 Funktion des Knochens

Dem Knochen unterliegen zahlreiche Funktionen. Er erfüllt nicht nur die Stützfunktion im Körper, sondern dient auch dem Schutz der Organe und des Knochenmarks vor äußeren Einflüssen. Weiters stellt der Knochen das größte Calciumdepot des Körpers dar. Durch die Freisetzung von Calcium und verschiedenen Wachstumsfaktoren, wie z.B. „Transforming growth factor“ (TGF) β und „Insulin-like growth factor“ (IGF)1, welche sich in der Knochenmatrix befinden, ist der Knochen auch ein wichtiges Werkzeug des Körpers zur Aufrechterhaltung der Ionenhomeostase [2].

Der Knochen unterliegt einem ständigen Auf- und Abbau, welcher durch die Knochenzellen, Osteoblasten (OB) und Osteoklasten (OC), reguliert wird. Durch diesen ständigen Umbau stellt der Knochen beschädigte Knochenregionen wieder her und gleicht Ernährungseinflüsse oder Änderungen im Hormonhaushalt (z.B. Estrogen) auf den Calciumspiegel im Blut aus [3].

Der Knochenumbau erfolgt in folgenden Schritten: 1. Resorption von alten oder beschädigten Knochen durch die OC und 2. Bildung von neuem Knochen durch OB [3].

Neben OB und OC beeinflussen auch Osteozyten den Knochenstoffwechsel. Osteozyten leiten sich von den OB ab und sind in der Knochenmatrix eingebettet. Sie befinden sich innerhalb der Knochenkanäle und dienen der Zell-Zell-Kommunikation zwischen neugebildeten OB und benachbarten Osteozyten sowie der Hemmung des Knochenabbaus durch OC. Durch diese Kommunikation zwischen den Zellen, der Bildung von Kollagenfasern und der Regulierung von Osteoklasten und Mineralisation beeinflussen sie sowohl das Knochenwachstum als auch die -resorption [3].

2.2 Osteoklasten

OC sind große, mehrkernige Zellen, welche ihren Ursprung in den hämatopoietischen Stammzellen des Knochenmarks haben. Ausgehend von diesen Stammzellen entwickeln sich OC über „Colony-forming unit for granulocytes and macrophages“ (CFU-GM) und „Colony-forming unit for macrophages“ (CFU-M) zu Prä-OC [4]. Durch Fusion dieser Vorläuferzellen entstehen letztendlich mehrkernige OC (siehe Abbildung 1) [2].

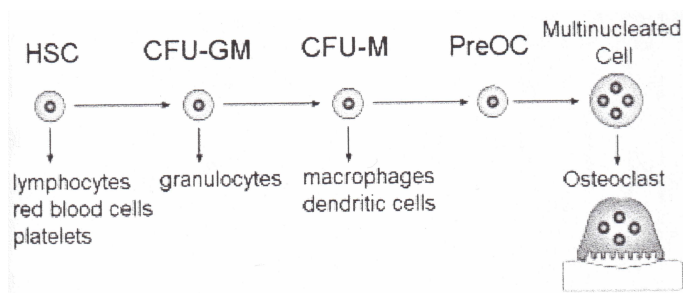


Abbildung 1: Bildung der Osteoklasten [4]. HSC: hämatopoietische Stammzellen. CFU-GM: „Colony-forming unit for granulocytes and macrophages“. CFU-M: „Colony-forming unit for macrophages“. PreOC: Prä-OC „Multinucleated cells“: mehrkernige Zelle.

Ein wichtiges Merkmal der OC ist deren Expression von Tartrat-resistenter saurer Phosphatase (TRAP). Da dieses Enzym in allen Stadien der Entwicklung freigesetzt wird, wird es als spezifisches Marker-Protein zur Identifizierung von OC verwendet [5-6].

2.2.1 Differenzierung

Ein essentieller Faktor für die Osteoklastogenese ist der receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL). RANKL gehört zur Tumornekrose-Faktor (TNF)-Familie und wird von OB und deren Vorläuferzellen gebildet [7]. Er wird aber auch in den Lymphknoten, Thymus, Lunge und anderen Geweben, wie dem Knochenmark, gebildet [2].

Die Differenzierung von OC aus ihren Vorläuferzellen wird während des normalen Knochenumbaus durch die OB gesteuert. OB sezernieren nicht nur RANKL, sondern auch macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), der ebenfalls ein essentieller Faktor für die Reifung von OC ist. Ersterer bindet an seinen Rezeptor receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK), welcher sich an der Oberfläche der OC-Vorläuferzellen befindet. Durch die Bindung von RANKL an seinen Rezeptor kommt es zur Aktivierung einer Signalkaskade, welche über die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, c-Fos, Phospholipase C γ und nuclear factor of activated T-cells (NFATc1) letztendlich in der Differenzierung des Pre-OC zum OC endet. M-CSF hingegen bindet ebenfalls auf den Vorläuferzellen an seinen Rezeptor, c-fms, was eine Signalkaskade über mitogen-activated protein (MAP)-Kinasen und extracellular-signal regulated Kinasen (ERKs) auslöst. M-CSF schützt auf diesem Wege OC vor Apoptose und erhöht deren Aktivität [5].

Die Aktivität von RANKL und somit die Osteoklastogenese wird von Osteoprotegerin (OPG) negativ beeinflusst. OPG, ein löslicher Rezeptor, ist eng mit RANK verwandt und wird wie dieser von OB und B-Zellen gebildet [7]. Er konkurriert mit RANK um den Liganden RANKL und hemmt folglich deren Interaktion [8]. Somit ist der Knochen in der Lage, selbst seinen Umbau durch OB und OC zu regulieren.

OC sind nicht nur für die Knochenresorption zuständig, sondern sie regulieren auch die Funktion anderer Zellen, so sezernieren sie Cytokine wie z.B. Koloniestimulierende-Faktoren (CSF), regulieren die Ausschüttung hämatopoietischer Stammzellen aus dem Knochenmark und besitzen eine Funktion als Immunzellen bei verschiedenen Krankheiten des Knochens [8].

Weitere Hormone, welche einen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel haben sind Calcitriol, Parathormon und Calcitonin.

Calcitriol ($1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$) ist ein Metabolit des Vitamin D₃ und stimuliert das OC-Wachstum, indem es die Fusion der Vorläuferzellen begünstigt. Weiters induziert es die Expression von RANKL in OB [5].

Parathormon ist ein Peptid, welches in den Nebenschilddrüsen gebildet wird. Durch seinen stimulierenden Effekt auf die OC und somit auf die Knochenresorption, spielt es eine wichtige Rolle bei der Regulation des Calciumspiegels im Körper [5].

Zahlreiche Arzneistoffe die bei Knochen-Krankheiten eingesetzt werden, wie z.B. Bisphosphonate, aber auch natürliche Substanzen wie das Hormon Estrogen, hemmen das OC-Wachstum oder deren Aktivität [8] [5].

2.2.2 Funktionsweise

OC sind für den Knochenabbau zuständig, wobei beide Phasen der Knochenmatrix, die mineralische und die organische, abgebaut werden. Seine im Vergleich zu anderen Zellen beachtliche Größe ermöglicht es dem Osteoklasten, effizient zu arbeiten [4].

Um seine Aktivität entfalten zu können, muss der OC eine saure Umgebung schaffen, da die Auflösung des Knochenminerals und die Verdauung der organischen Knochenmatrix durch saure Hydrolasen nur bei saurem pH-Wert funktionieren [4].

Die Resorption der Knochenmatrix besteht nun aus folgenden Schritten: 1. Fusion von OC-Vorläuferzellen und damit Bildung von OC, 2. Anlagerung der OC an die Knochenmatrix über die Bildung eines Aktin-Rings, 3. Bildung der Resorptionslakune, 4. Abbau der Knochenmatrix und 5. Abtragung der entstandenen Abfallprodukte, wie z.B. Kollagenfragmente und auch von Ionen.

Im Detail erfolgt dieser Prozess folgendermaßen: Zunächst muss sich der OC an den Knochen anlagern. Dies wird über $\alpha_v\beta_3$ Integrin vermittelt. Danach bildet der OC eine Resorptionslakune, in welcher ein saures Milieu herrscht und in der die eigentliche Resorption erfolgt. Während der Resorption wird in der Zelle aus CO₂ und H₂O Kohlensäure gebildet. Die Carboanhydrase katalysiert dessen Zerfall zu HCO₃⁻ (Bicarbonat) und Protonen. Die gebildeten Protonen werden mithilfe einer Protonenpumpe in die Resorptionslakune befördert, wo sie sich anreichern. Währenddessen wird das Bicarbonat im Austausch gegen Chlorid aus der Zelle

transportiert. Über einen Chloridkanal gelangt dieses dann ebenfalls in die Resorptionslakune, wo es gemeinsam mit den Protonen HCl (Salzsäure) bildet, was zu einer Senkung des pH-Wertes führt. Durch die Salzsäure wird das Hydroxylapatit der Knochenmatrix abgebaut. In der Resorptionslakune finden sich außerdem verschiedene Enzyme, wie zum Beispiel Cathepsin K, welche ebenfalls am Knochenabbau beteiligt sind (siehe Abbildung 2) [4].

Die Produkte, welche durch den Knochenabbau entstanden sind, müssen danach aus den Zellen entfernt werden. Dazu werden sie in Vesikel verpackt und aus der Zelle ausgeschleußt.

Nach Beendigung der Resorption löst sich der OC von der Matrix und bindet entweder an eine neue Resorptionsstelle oder stirbt durch Apoptose [4].

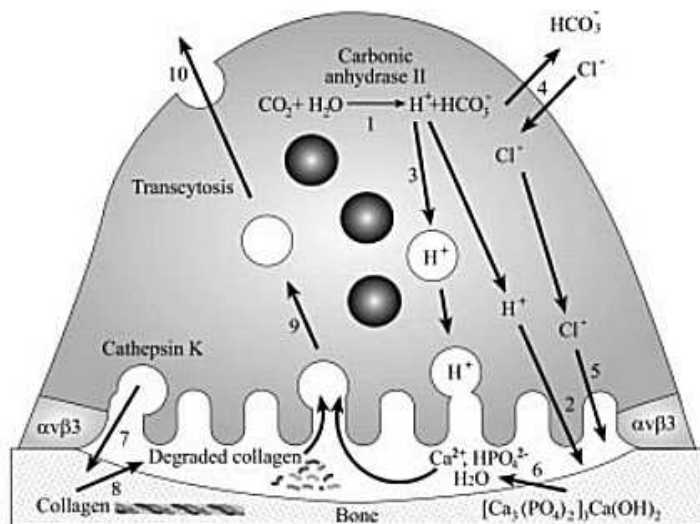


Abbildung 2: Schritte der Knochenresorption durch den Osteoklasten [4]. Aus CO_2 und H_2O wird Kohlensäure gebildet, welche durch die Carboanhydrase zu Protonen und HCO_3^- zerfällt (1). Mithilfe der Protonenpumpe reichern sich die entstandenen Protonen in der Resorptionslakune an (2,3). Chlorid gelangt im Austausch gegen HCO_3^- in die Zelle (4) und wird über einen Chlorid-Kanal ebenfalls in die Resorptionslakune transportiert (5). Durch die entstandene HCl, sowie verschiedene Enzyme wird das Hydroxylapatit des Knochens abgebaut (6-8). Anschließend erfolgt über Vesikel der Abtransport der Knochenabbau-Produkte (9,10).

2.3 Osteoklasten-assoziierte Erkrankungen

Es gibt zahlreiche Erkrankungen, welche mit einer erhöhten Osteoklasten Aktivität einhergehen.

2.3.1 Osteoporose bzw. Osteopenie

Definition

Osteoporose ist die häufigste Erkrankung des Skeletts im Alter. Ursache ist eine reduzierte Knochendichte, was zu einem erhöhten Risiko für Knochenbrüche führt [9]. Aus diesem Grund sind z.B. Handgelenk-, Hüft- und Wirbelbrüche auch Hinweise auf diese Erkrankung. Das Risiko für Osteoporose steigt signifikant mit dem Alter, aber auch geschlechtsspezifische Unterschiede sind eindeutig erkennbar. Frauen sind wesentlich häufiger betroffen als Männer, da bei ihnen die Abnahme der Knochendichte während der Menopause durch die abfallenden Estrogen-Spiegel stark beschleunigt ist. So liegt das Risiko bei Frauen einen Knochenbruch zu erleiden bei 40 %, bei Männern hingegen nur bei 13 % [10].

Die World Health Organization (WHO) legte Definitionen in Zusammenhang mit der Knochenmineraldichte (BMD, „bone mineral density“) von Osteopenie und Osteoporose fest. Liegt die BMD zwischen -1 und -2,5 Standardabweichungen vom Mittelwert gesunder Menschen, so spricht man von Osteopenie. Wenn sie aber um mehr als -2,5 Standardabweichungen abweicht, liegt eine Osteoporose vor. Als Standard werden Männer und Frauen mit einem Alter von 20–29 Jahren herangezogen, da die Knochendichte in diesem Alter am höchsten ist [11]. Zur Messung der Knochendichte wird am häufigsten der „Dual energy X-ray absorptiometry“ (DXA)-Scan verwendet. Bei dieser Messung erfolgt eine Aufnahme durch zwei verschiedene Röntgenquellen, wodurch sich eine Aussage über die verschiedenen Dichten innerhalb und auf beiden Seiten des Knochens machen lässt. Die Reproduzierbarkeit ist sehr hoch und die Strahlenbelastung gering [10].

Formen

Man kann zwischen verschiedenen Formen der Osteoporose unterscheiden. Dazu zählen die primäre Osteoporose vom Typ 1 und Typ 2 und die sekundäre Osteoporose. Die primäre Osteoporose vom Typ 1 ist die häufigste Form und betrifft vor allem Frauen in der Menopause. Als Ursache wird die während der Menopause auftretende Estrogenabnahme angesehen.

Beim Typ 2 sind auch Männer miteingeschlossen. Diese Form tritt als normale Folge des Alterungsprozesses der Knochen auf.

Von der sekundären Form der Osteoporose sind ebenfalls sowohl Männer als auch Frauen betroffen. Dieser Art der Osteoporose liegt eine Grunderkrankung zugrunde, oder sie ist Medikamenten induziert, z.B. infolge einer Glucocorticoidtherapie [12].

Risikofaktoren

Zahlreiche Faktoren erhöhen das Risiko an Osteoporose zu erkranken. Beispiele sind in Tabelle 1 angeführt.

Tabelle 1: Risikofaktoren einer Osteoporose [10]

Skelletal	Extraskelletal
Erniedrigte Knochenmineraldichte	Hohes Alter
Niedriger Body Maß Index	Zigaretten- und Alkoholkonsum
Pathologische Veränderungen der Knochenstruktur	Ernährung
Knochenumsatz	Bewegungsarmut
Vorangegangene Frakturen	Hormone

Neben dem strukturellen Zustand des Skeletts spielt auch der Lebensstil eine entscheidende Rolle. So können z.B. erhöhter Zigaretten- und Alkoholkonsum sowie calciumarme Ernährung zu einer Osteoporose führen [10]. Aber auch Bewegungsarmut, Änderungen des Hormonhaushaltes, Medikamente, Grunderkrankungen [10] und genetische Prädispositionen [9] zählen zu den Risikofaktoren.

Vorbeugung und Therapie

An erster Stelle steht die Reduktion der Risikofaktoren, verbunden mit einer Änderung des Lebensstils. Dazu gehören Ernährungsumgestaltung, mehr Bewegung und die Vermeidung von Stürzen bei älteren Patienten. Regelmäßige

Knochendichtemessungen zur Abklärung des Knochenstatus sind ebenfalls unerlässlich.

Liegt eine manifeste Osteoporose vor, muss eine medikamentöse Behandlung eingeleitet werden, wobei als Basistherapie immer Calcium und Vitamin D zugeführt werden. Zusätzlich kann mit zwei Arzneistoffgruppen therapiert werden: den Antiresorptiva, welche den Knochenabbau verhindern und den Osteoanabolika, welche den Knochenaufbau fördern [13].

Antiresorptiva:

- Bisphosphonate: Diese leiten sich von Pyrophosphat ab, welche an Hydroxylapatit binden und so die OC-Tätigkeit hemmen.
Beispiele: Alendronat, Ibandronat, Risedronat, Zolendronat, Etidronat, Clodronat
- Selektive Estrogen-Rezeptor Modulatoren (SERMs): z.B. Raloxifen; es besitzt nicht nur positive Effekte auf den Knochen, sondern senkt auch das Brustkrebsrisiko und reduziert das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen.
- Estrogensersatztherapie: Die Behandlung mit Estrogenen ist umstritten, da sie einerseits das Frakturrisiko senken, andererseits aber unerwünschte Wirkungen, wie das Auftreten von Brustkrebs, besitzen.
- Strontiumranelat: Strontiumranelat hemmt die Knochenresorption und erhöht gleichzeitig die Knochendichte, kann also ebenfalls als osteoanabol bezeichnet werden.

Osteoanabolika:

- Tibolon: Tibolon ist ein synthetisches Steroid, welches an den Estrogenrezeptor bindet. Somit senkt es postmenopausale Symptome und erhöht die Knochenmineraldichte. Da aber keine Daten zur Vorbeugung von Frakturen vorliegen, wird Tibolon nicht als Basismedikation empfohlen.
- Parathormon: Die physiologische Funktion des Parathormons besteht in der Aufrechterhaltung des Calciumspiegels. Kontinuierliche Gaben aktivieren OC und bewirken dadurch einen Abbau des Knochens und damit eine Freisetzung von Calcium, wohingegen intermittierende Gaben vor allem die Resorption von Calcium aus dem Darm anregt wodurch der Einbau von

Calcium in die Knochen und somit der Knochenaufbau reflektorisch erhöht wird.

2.3.2 Morbus Paget

Morbus Paget ist nach der Osteoporose die zweithäufigste Erkrankung des Knochens und betrifft meist Patienten ab dem 50. Lebensjahr, wobei Männer und Frauen etwa gleich häufig betroffen sind.

Beim Gesunden unterliegt der Knochen einem konstanten Umbau. Bei dieser Krankheit kommt es allerdings zu einem abnormalen Knochenumsatz. Zu Beginn überwiegt die Knochenresorption durch OC. Auf diese folgt Knochenneubildung durch OB. Durch eine erhöhte Knochenneubildung kommt es letztendlich zu Knochendeformationen.

Die Zahl der OC ist bei der Erkrankung stark erhöht, ebenso deren Größe und die Anzahl der Zellkerne. Während beim Gesunden die OC 3–20 Kerne besitzen, steigt deren Zahl bei Morbus Paget auf bis zu 100. Die OC-Vorläuferzellen sind sensitiver gegenüber Wachstumsfaktoren, was zu dieser gesteigerten OC-Formation beiträgt.

Zu den Symptomen zählen Schmerzen, Deformation des Knochens, Frakturen, Verlust des Hörvermögens, sowie Kopfschmerzen.

Da die Erkrankung hauptsächlich durch erhöhte OC-Tätigkeit zustande kommt, richtet sich die Therapie gegen diese Zellen. Zu den pharmakologischen Behandlungsmöglichkeiten zählen Calcitonin, welches das OC-Wachstum und deren Funktion hemmt, sowie Biphosphonate. Diese hemmen nicht nur das Wachstum der OC, sondern führen auch zu deren Apoptose [14].

2.3.3 Riesenzelltumor

Der Riesenzelltumor des Knochens ist ein aggressiver, lokal osteolytischer Tumor und betrifft etwa ein Fünftel aller Knochentumore [15]. Er tritt hauptsächlich bei jungen Erwachsenen nach Schluss der Epiphysenfugen auf. Seinen Ursprung hat der Tumor meist in den Epiphysen der langen Röhrenknochen [16]. Die Patienten leiden oft unter Schmerzen und Schwellungen, welche durch die Vergrößerung des Tumors zustande kommen. Da Riesenzelltumore sehr aggressiv sind, kann es

zum Befall des Knochenkerns und zur Ausbreitung in das umliegende Gewebe kommen. Bei ca. 2 % der Fälle bilden sich Lungenmetastasen [15].

Der Riesenzelltumor weist drei verschiedene Zelltypen auf. Dazu zählen die mehrkernigen, OC-ähnlichen Riesenzellen sowie zwei Arten mononukleärer Zellen – spindelförmige und epitheloide [17]. Die Riesenzellen verfügen über die gleichen Eigenschaften wie OC. Sie sezernieren ebenfalls die Marker TRAP und Calcitoninrezeptor und bauen die Knochenmatrix ab. Ein Unterschied besteht allerdings in der Anzahl der Zellkerne. Während OC nur 3–15 Zellkerne aufweisen, können Riesenzellen bis zu 100 Kerne enthalten [17], weshalb der Tumor auch als „Osteoklastom“ bezeichnet wird [15].

Die Behandlung des Tumors besteht vorwiegend aus der chirurgischen Entfernung des betroffenen Gewebes [18] und einer Behandlung mit Bisphosphonaten, da diese die OC-induzierte Knochenresorption hemmen [15].

2.4 Melatonin

2.4.1 Allgemeine Informationen

Melatonin, dessen chemischer Name N-acetyl-5-methoxytryptamin lautet, ist ein Derivat der essentiellen Aminosäure Tryptophan (Abbildung 3). 1958 wurde es erstmals aus der Zirbeldrüse von Rindern isoliert und von Lerner et al identifiziert. Sein Name leitet sich von seiner Fähigkeit bestimmte Hautzellen, die Melanozyten, aufzuhellen, ab [19].

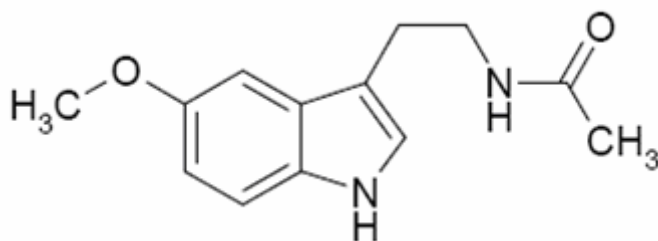


Abbildung 3: Struktur von Melatonin

Bei Säugetieren wird Melatonin vorwiegend in der Zirbeldrüse gebildet, aber auch in der Retina, dem Gastrointestinaltrakt, dem Knochenmark, der Haut [20] und der Linse [21].

Melatonin kommt allerdings nicht nur in Säugetieren vor. Es wurde ebenso in wirbellosen Tieren, Fischen, einzelligen Algen, Bakterien, Pilzen, und Gefäßpflanzen gefunden, wobei die Konzentration zwischen den einzelnen Spezies beträchtlich variiert [22].

Melatonin wird oft als Hormon charakterisiert, obwohl es sich in zahlreichen Eigenschaften von diesem unterscheidet. Als Hormone werden Botenstoffe bezeichnet, welche in einem endokrinen Organ gebildet und an die Umgebung abgegeben werden und schließlich an ihrem Zielort ihre Wirkung entfalten. Melatonin wird in der Zirbeldrüse synthetisiert und ebenfalls ins Blut abgegeben. Wie oben erwähnt, wird es allerdings auch in geringem Ausmaß von nicht endokrinen Organen gebildet. Die meisten endokrinen Drüsen speichern einen Teil der von ihnen produzierten Hormone, für Melatonin jedoch konnte kein Speicherort gefunden werden. Ein weiterer Unterschied zwischen Melatonin und klassischen Hormonen ist dessen Vorkommen in allen Organismen, während Hormone eigentlich nur in mehrzelligen Organismen zu finden sind. Hormone entfalten ihre Wirkung, indem sie am Zielort an einen Rezeptor binden. Melatonin besitzt im Gegensatz dazu auch nicht-Rezeptor vermittelte Wirkungen, wie z.B. seine antioxidative Kapazität (siehe Kapitel 2.4.5). Da Melatonin auch in verschiedenen Lebensmitteln wie Gemüse, Früchten, Samen, u.a. vorkommt, könnte es auch als Vitamin eingestuft werden [21].

2.4.2 Biosynthese

Melatonin wird aus der Aminosäure L-Tryptophan, welche zunächst in die Zirbeldrüse aufgenommen werden muss, synthetisiert. Durch Hydroxylierung und anschließende Decarboxylierung entsteht Serotonin. Dieses wird durch die Arylalkylamin N-Transferase (AANAT) zu N-Acetylserotonin (NAS, N-Acetyl-5-Hydroxytryptamin) acetyliert. Im letzten Schritt erfolgt mithilfe des Enzyms Hydroxyindol-O-Methyltransferase (HIOMT) die Umwandlung zu Melatonin (N-Acetyl-5-Methoxytryptamin; siehe Abbildung 4) [23].

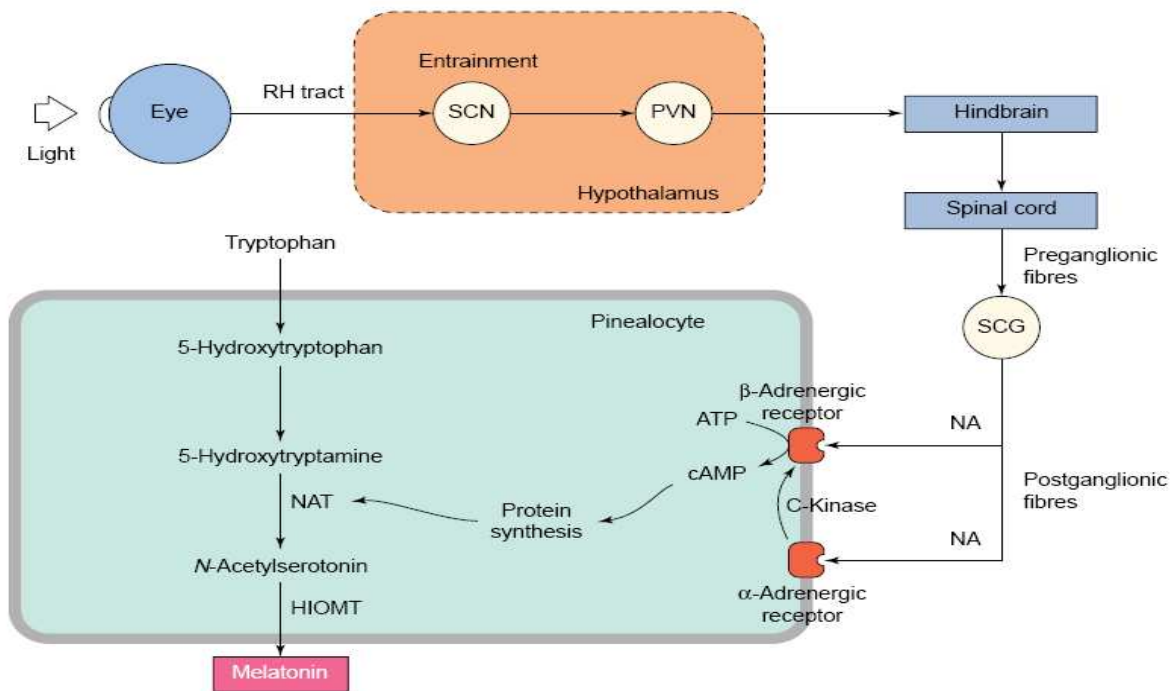


Abbildung 4: Biosynthese von Melatonin [34]. Ausgehend von einem Lichtsignal durch den Retino-Hypothalamischen Signalweg, beginnt die Synthese im suprachiasmatischen Kern (SCN). Über den Paraventriculären Kern (PVN), Cerebrellum (Hindbrain), Rückenmark (Spinal cord), und „Superior cervical ganglion“ (SCG) gelangt das Signal zu den pinealen, noradrenergen (NA) Rezeptoren. Ausgehend von Tryptophan erfolgt die Synthese mithilfe der Enzyme Arylalkylamin N-Transferase (NAT) und Hydroxyindol-O-Methyltransferase (HIOMT).

Ein wesentliches Charakteristikum von Melatonin sind die tageszeitlichen Schwankungen seiner Serumkonzentration, welche bei Tag niedrig und in der Nacht hoch ist (10–100-fache Menge als am Tag). Das geschwindigkeitsbestimmende Enzym für diese tageszeitabhängige Produktion von Melatonin in der Zirbeldrüse stellt AANAT dar [24-25].

Das Regulationssystem für die circadiane Expression von AANAT und somit der Melatonin-Synthese ist im suprachiasmatischen Kern (SCN) des Hypothalamus lokalisiert. Über Photorezeptoren in der Retina empfängt der SCN Lichtsignale. Nach dessen Stimulation in der Nacht sezerniert er Norepinephrin in die Zirbeldrüse. Über β_1 -Adrenorezeptoren aktiviert es die Adenylatcyclase (AC), die intrazelluläre Calcium-Konzentration steigt. Gleichzeitig stimuliert es auch α_1 -Adrenorezeptoren und aktiviert die Proteinkinase C (PKC). Diese zwei Mechanismen führen zu einem raschen Anstieg des Second Messengers cAMP. cAMP führt zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), welche 2 Aufgaben hat: 1. sie phosphoryliert AANAT, wodurch dieses einen Komplex mit 14-3-3 Proteinen

bildet, was den Abbau von AANAT verhindert, und 2. erhöht sie durch Phosphorylierung von CREB (cAMP regulatory element-binding protein) die Transkription von AANAT mRNA (siehe auch Abbildung 4) [24-25].

2.4.3 Metabolismus

Der Großteil des zirkulierenden Melatonins wird in der Leber abgebaut. Durch Cytochrome P450, hauptsächlich durch die CYP1A2 Isoform, wird es zu 6-Hydroxymelatonin hydroxyliert. Das entstandene 6-Hydroxymelatonin wird durch die Sulfotransferase (SULT) 1A1 mit Sulfat konjugiert und über den Urin ausgeschieden. Ein kleiner Teil des Melatonins wird durch o-Demethylierung zu N-Acetyl-5-Hydroxytryptamin, welches ebenfalls über den Urin ausgeschieden wird (siehe Abbildung 5) inaktiviert [26].

Melatonin unterliegt einem raschen Metabolismus und besitzt eine kurze Halbwertszeit von 10–60 Minuten [20].

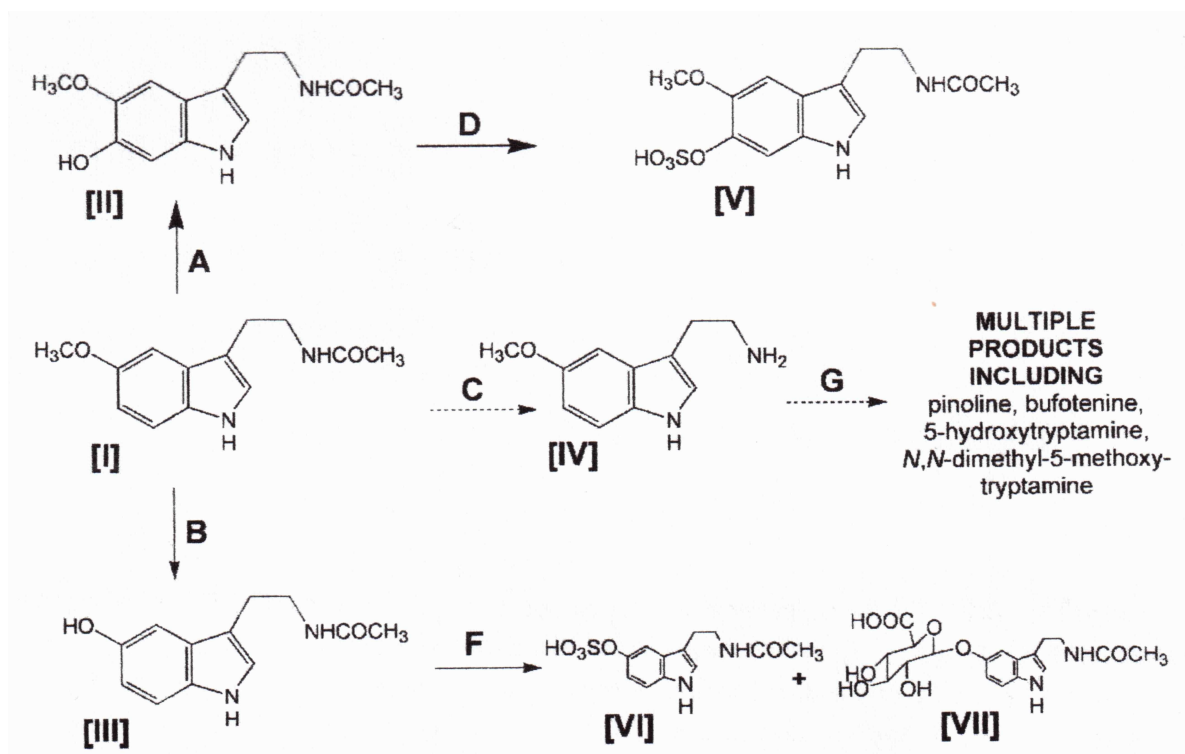


Abbildung 5: Metabolismus von Melatonin (siehe auch Fließtext) Melatonin [I] wird entweder durch 6-Hydroxylierung zu 6-Hydroxymelatonin [II], welches zu 6-Sulfatoxymelatonin [V] sulfatiert und ausgeschieden wird, oder durch o-Demethylierung zu N-Acetyl-5-Hydroxytryptamin, welches zum Sulfat [VI] oder Glucuronat [VII] konjugiert wird. Ein kleiner Teil des Melatonins [I] wird zu 5-Methoxytryptamin [IV] deacetyliert, welches zu verschiedenen Metaboliten abgebaut wird [26].

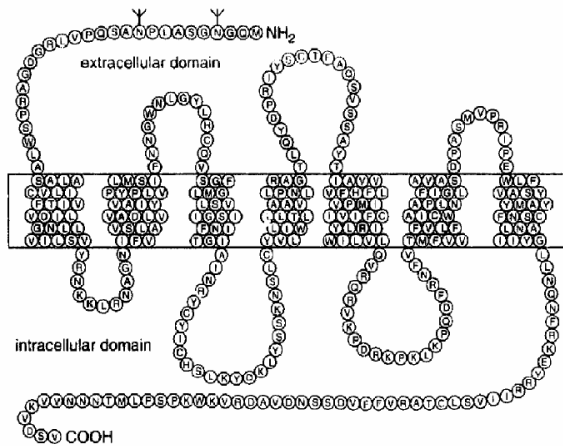
2.4.4 Melatonin-Rezeptoren

Die Entdeckung des Radioliganden 2-[¹²⁵I]Iodomelatonin ([¹²⁵I]Mel) erlaubte die Charakterisierung und Lokalisierung von Melatonin-Rezeptoren. Durch die unterschiedliche Affinität und Kinetik gegenüber dem Radioliganden können Melatonin-Rezeptoren in zwei Gruppen eingeteilt werden, ML₁ und ML₂, wobei ersteres eine höhere Affinität zu [¹²⁵I]Mel als letzteres aufweist [27]. Nachdem 1994 der erste Melatonin-Rezeptor aus *Xenopus laevis* geklont wurde, erkannte man, dass drei Melatonin-Rezeptor Subtypen mit gleichen Eigenschaften wie ML₁ existieren, nämlich Mel 1a, Mel 1b und Mel 1c, wobei die ersten beiden später in MT₁ und MT₂ umbenannt wurden [28]. MT₁ sowie MT₂ kommen in Säugetieren vor, während Mel 1c nur in nicht-Säugetieren, wie z.B. Fischen, exprimiert wird [29]. ML₂ wird in Kapitel 2.4.4.3 näher behandelt.

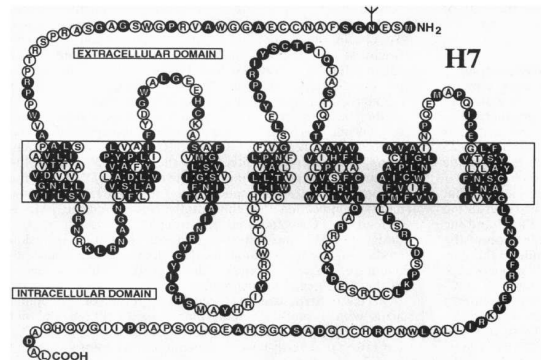
MT₁ wird in Säugetieren vor allem im Gehirn und im speziellen im SCN exprimiert, ist aber auch in Retina, Ovar, Niere, Darm, Lunge, Leber, Milz, Hoden, Herz, Arterien, Lymphozyten oder Magen [30] zu finden. MT₂ wird in geringerem Ausmaß exprimiert und ist vor allem im Gehirn, in Cornea und Retina [20, 28], sowie dem Ovar und der Niere [30] lokalisiert.

Struktur

Die Melatonin-Rezeptoren MT₁ und MT₂ gehören zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Bei Säugetieren bestehen sie aus 350 bzw. 362 Aminosäuren und besitzen 7 transmembranäre Domänen (Abbildung 6). In der N-terminalen Domäne befinden sich Glycosylierungs-Stellen. Der vierte intrazelluläre Loop verfügt über Cystein-Reste und in der C-terminalen Domäne befinden sich Phosphorylierungs-Stellen für Proteinkinase A und C [31].



MT₁



MT₂

Abbildung 6: Membranstruktur der Melatonin-Rezeptoren MT₁ und MT₂ [32-33]

GPCR neigen zur Oligomer-bzw. Dimerbildung. Diese Dimere können sich entweder aus zwei gleichen (Homodimer) oder zwei verschiedenen (Heterodimer) GPCRs zusammensetzen. So bilden auch Melatonin-Rezeptoren Homo- bzw. Heterodimere, wobei sich bevorzugt MT₁ / MT₂-Heterodimere bzw. MT₁ Homodimere formen. Melatonin-Rezeptoren können aber auch mit anderen GPCRs eine Dimerbildung eingehen, wie z.B. dem Orphan GPR50 Rezeptor [28].

Signaltransduktion

Die Wirkungsweise von Melatonin über seine Rezeptoren ist relativ komplex: MT₁-Rezeptoren aktivieren G_i- aber auch G_q-Proteine und hemmen die Adenylatcyclase sowie Phospholipase C und A₂ (PLC, PLA₂) [34]. Weiters hemmt MT₁ die Phosphorylierung von CREB (cAMP responsive element binding protein) und fördert die Phosphorylierung verschiedener Proteine durch unterschiedliche Kinasen [28].

MT₂-Rezeptoren beeinflussen ebenfalls verschiedene Signalwege, dazu gehören die Hemmung der Adenylatcyclase über G_i sowie der löslichen Guanylatcyclase und Stimulierung der PKC. In Prostata-tumorzellen scheint Melatonin durch Erhöhung von cyclischem Guanosin Monophosphat (cGMP) eine Hemmwirkung auf diese Zellen zu entfalten [35].

Weitere Melatonin-Rezeptoren

Neben den GPCRs MT_1 , MT_2 und Mel 1c wurde 1988 ein weiterer Rezeptor bei Nagetieren entdeckt, welcher ursprünglich als ML_2 (MT_3) bezeichnet wurde. Dieser Rezeptor weist andere Eigenschaften als MT_1 und MT_2 auf. Er besitzt eine geringere Affinität zu Melatonin und verfügt über andere Funktionen, wie z.B. seine Wirkung über Phosphoinositolhydrolyse [28].

Spätere Untersuchungen identifizierten MT_3 , als das Enzym Quinone-Reduktase 2 (QR2), welches oxidoreduktive Eigenschaften besitzt [36]. Es wird angenommen, dass die antioxidative Wirkung von Melatonin zumindest teilweise auf eine Hemmung der QR2 zurückzuführen ist [28].

Melatonin wirkt nicht nur über Membran-Rezeptoren, sondern es ist auch ein Ligand für den „Retinoid related orphan nuclear receptor“ (RZR / ROR α), welcher einen nukleären Rezeptor darstellt. Über diesen Rezeptor könnte Melatonin an der Regulation von Lymphozyten beteiligt sein [31].

Melatonin interagiert aber auch mit verschiedenen intrazellulären Proteinen, wie Calmodulin oder Calreticulin [31].

2.4.5 Funktionen und Anwendung

Melatonin besitzt zahlreiche physiologische Funktionen. Wie bereits erwähnt, erfolgt seine Freisetzung in der Dunkelheit in der Nacht, wobei das Ausmaß der Sekretion mit der Länge der Dunkelheit korreliert. Die wichtigste Aufgabe von Melatonin besteht wohl in der Kontrolle des tierischen zirkadianen Rhythmus dem verschiedene Körperfunktionen unterliegen, wie z.B. Schlaf, Appetit, Pigmentation, Körpergewicht, Körpertemperatur etc. [20][37]

Unabhängig von seinen Rezeptor-vermittelten Effekten wirkt Melatonin als Antioxidans. Aufgrund seiner hohen Lipidlöslichkeit kann Melatonin durch die Zellmembran dringen und schützt so die gesamte Zelle vor oxidativer Zerstörung [38]. Es ist nicht nur in der Lage, eine Vielzahl an freien Radikalen, reaktiven Sauerstoff- und Nitrogenspezies zu neutralisieren, sondern es reguliert auch eine Reihe von antioxidativen Enzymen, wie z.B. Katalase [39] und pro-oxidativen Enzymen, wie z.B. induzierte NO-Synthase und Superoxid Dismutase [40]. Eine wichtige Rolle für seine antioxidative Wirkung spielen die O-Methyl- und die N-

Acetyl-Gruppe. Nicht nur Melatonin selbst, sondern auch seine Metabolite N-acetyl-N-formyl-5-methoxykynuramin (AFMK) und N-acetyl-5-methoxykynuramin, welche über den Urin ausgeschieden werden, tragen zu seiner antioxidativen Wirkung bei. Melatonin wirkt gemeinsam mit anderen Antioxidantien, wie z.B. Vitamin C, Vitamin E oder Glutathion synergistisch [41]. Aufgrund dieser Eigenschaften könnte Melatonin zur Prävention von zahlreichen altersbedingten Krankheiten, wie Alzheimer oder Parkinson eingesetzt werden [42].

Weitere Funktionen von Melatonin liegen in einer noch nicht vollständig geklärten positiven Wirkung auf das kardiovaskuläre System, einer Stimulation des Immunsystems und einer tumorprotektiven Wirkung [20].

Anwendung als Therapeutikum finden Melatonin und arzneistoffliche Analoga nicht nur als Antioxidans, sondern auch bei der Behandlung von verschiedenen Schlafstörungen, sowie bei Schlafproblemen ausgelöst durch Jetlag oder Schichtarbeit, aber auch bei Depressionen. Zu diesen Analoga zählen z.B. das Agomelatin, Ramelteon und das Tasimelteon [43]. Verschiedene Studien lassen auch auf einen möglichen Einsatz von Melatonin als Kardioprotektivum schließen, allerdings besteht auf diesem Gebiet noch Forschungsbedarf [44].

2.5 Einfluss von Melatonin auf den Knochen

Eine erste Indikation für eine Verknüpfung von Melatonin mit dem Knochenstoffwechsel ist die Tatsache, dass die Melatonin-Spiegel mit zunehmendem Alter sinken, was einen Zusammenhang zwischen Melatonin und anderen altersbedingten Krankheiten, wie z.B. Osteoporose, vermuten lässt [45].

Weiters sind hohe Konzentrationen von Melatonin im Knochenmark zu finden und der Knochenstoffwechsel folgt, ebenso wie die Melatonin-Ausschüttung, einem 24-Stunden-Rhythmus, wobei Knochen-Resorption und -Formation in der Nacht erhöht sind [46].

Schließlich belegen Studien einen direkten Effekt von Melatonin auf die Knochen-metabolisierenden Zellen, den OBs sowie OCs [45] (siehe Abbildung 7).

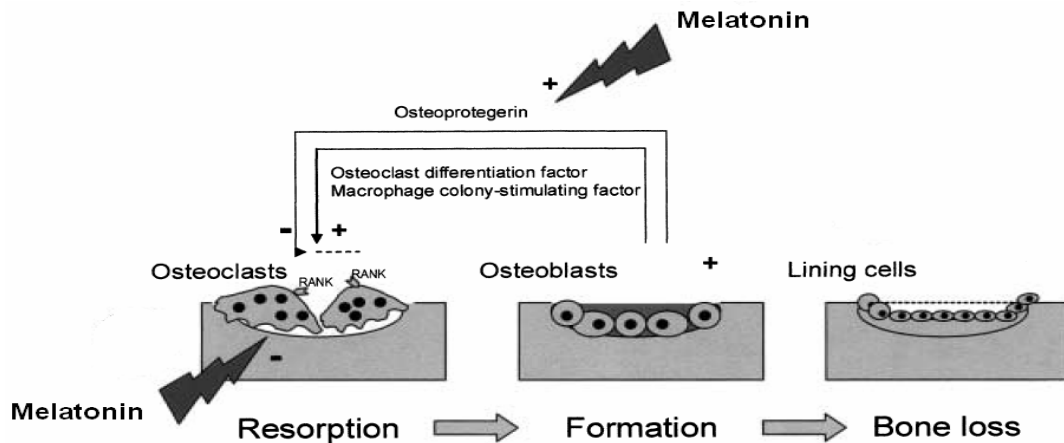


Abbildung 7: Effekte von Melatonin auf den Knochen. Melatonin besitzt einen fördernden Effekt auf die OB Proliferation, sowie auf die Bildung von Osteoprotegerin. Es hemmt auch die Bildung von RANKL. Außerdem hemmt es die Knochenresorption durch seinen antioxidativen Effekt [45].

In einer Studie von Koyama et al. 2002 [47] wurde getestet, ob Melatonin-Gaben die Knochendichte erhöhen und ob dies durch Zunahme der Knochenneubildung oder durch Abnahme der Knochenresorption geschieht. Dazu wurden Mäuse 4 Wochen täglich mit 5 bzw. 50 mg / kg Melatonin behandelt, was zu einer signifikanten Erhöhung der BMD führte. Histomorphometrische Untersuchungen ergaben, dass durch die Melatonin-Behandlung die Anzahl an aktiven OC sowie deren Aktivität signifikant abfiel, wohingegen kein Effekt auf die OB-Anzahl und die Knochenneubildung festgestellt werden konnte. Man nimmt an, dass die Hemmung der Knochenresorption nicht durch eine direkte Wirkung von Melatonin auf OC, sondern vielmehr durch Einfluss auf die Vorläuferzellen und OB zustande kommt. Wie bereits erwähnt sind RANKL und OPG wichtige Faktoren bei der OC-genese, wobei diese durch RANKL stimuliert und durch OPG inhibiert wird. Um die Expression von RANKL zu überprüfen, wurde nach der Behandlung der Zellen mit 5-500 μ M Melatonin bzw. dem Vehikel, die „messenger“ Ribonukleinsäure (mRNA) Menge für RANKL bestimmt. Es zeigte sich, dass Melatonin-Konzentrationen von 10 μ M oder höher zu einer signifikanten Reduktion der Expression von RANKL auf mRNA-Ebene führte. Zur Beurteilung des Effekts von Melatonin auf die Produktion von OPG, wurde nach der Behandlung mit Melatonin bzw. dem Lösungsmittel, eine Northern Blot Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse wiesen eine signifikante Erhöhung der OPG-Produktion bei Melatonin-Konzentrationen von 10 μ M oder höher auf. Die Hemmung der Knochenresorption durch Melatonin beruht also auf einer Downregulation der RANKL-vermittelten OC-Bildung und -aktivierung [47].

Dieser Mechanismus konnte von Histing et al. (2010) [48] insofern bestätigt werden, dass durch die Behandlung mit Melatonin die Expression von RANKL tatsächlich sank. Die Expression von OPG allerdings wurde in den in vivo Studien nicht beeinflusst.

Eine weitere Studie beschäftigte sich mit dem Einfluss von Melatonin auf OC und Osteoblasten in Goldfisch-Schuppen (in vorangegangenen Versuchen war das Vorkommen von OC und Osteoblasten in Goldfisch-Schuppen nachgewiesen worden [49]). Zur Untersuchung dieser Knochenzellen wurde TRAP als Marker für die OC-Tätigkeit, und alkalische Phosphatase (ALP) als Marker für die OB-Tätigkeit, verwendet. Man fand heraus, dass durch Melatonin sowohl die TRAP- als auch die ALP-Aktivität abnahm. Das legt nahe, dass Melatonin einen hemmenden Einfluss auf beide Knochenzellen zu besitzen scheint. Weiters wurde in diesem Experiment der Zusammenhang zwischen Estrogen und Melatonin untersucht. Estrogen erhöhte die Aktivität der Enzyme TRAP und ALP. Durch die zusätzliche Gabe von Melatonin sank allerdings deren Aktivität wiederum ab. Da die Dauer des Melatonin-Einflusses auf die OC länger anhält, wird in dieser Studie spekuliert, dass Melatonin die Knochenzellen auf unterschiedliche Weise beeinflusst. Dies ist die erste Studie, welche einen hemmenden Effekt von Melatonin auf OB zeigt. Allerdings wurden in dieser Studie isolierte OB verwendet, während in vivo OB und OC über Zell-Zell Kontakte in Verbindung stehen [49].

Um den Knochen abzubauen wirken in OC unter anderem freie Radikale, vor allem Superoxid Anionen. Melatonin wiederum ist ein potentes Antioxidans. Möglicherweise ist Melatonin aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaften fähig, den Knochen vor dem Abbau durch OC auch auf diese Weise zu schützen [45].

2.5.1 Melatonin und Knochenkrankheiten

Die Melatonin-Konzentration nimmt mit zunehmendem Alter, vor allem während der Menopause, ab, womit ein Zusammenhang zwischen Melatonin und altersbedingten Krankheiten möglich ist [45]. Wie bereits erwähnt ist die häufigste Knochenerkrankung im Alter die Osteoporose, mit der ein erhöhtes Frakturrisiko einhergeht. Die Hauptursache dieser Krankheit ist eine Abnahme des Estrogenspiegels [10].

Eine Studie von Ladizesky et. al. aus dem Jahr 2003 [50] untersuchte den Zusammenhang zwischen Melatonin und Estradiol auf die Knochenbildung in Ratten nach einer Ovariectomie. Als Parameter wurden Deoxypyridinolin, als Marker für die Knochenresorption, und die BMD herangezogen. Nach Ovariectomie stieg die Deoxypyridinolin-Ausscheidung. Nach Gabe von Melatonin oder Estradiol sank diese wieder. Die Effizienz von Estradiol der Knochenresorption entgegenzuwirken wurde durch zusätzliche Gabe von Melatonin verstärkt. Den besten Einfluss auf die BMD erzielte die gleichzeitige Verabreichung von Melatonin und Estradiol. Folglich kann man daraus schließen, dass der Knochenresorption infolge einer Ovariectomie bei Ratten durch die Gabe von Melatonin vorgebeugt werden kann, sofern sich noch genügend Estradiol im Serum befindet

Eine weitere Studie untersuchte den Einfluss von Melatonin auf die Heilung von Knochenbrüchen. Man stellte wiederum fest, dass Melatonin die Knochenresorption durch eine Verminderung der Expression von RANKL hemmt. Dies wiederum verlangsamt den Heilungsprozess, da der Knochen-Umbau für die Frakturheilung von größter Wichtigkeit ist. [48].

Ausgehend von der Tatsache, dass Melatonin die Knochenzellen beeinflusst, wurde ein neues Derivat entwickelt, das einen stärkeren, positiven, Effekt auf den Knochen besitzt als Melatonin, nämlich 6-Bromomelatonin. Diese Substanz hemmt die OC-Aktivität und steigert die der OB-Aktivität im Goldfisch-Schuppen Modell wesentlich stärker als Melatonin. Die genaue Wirkungsweise des neuen Moleküls ist nicht bekannt, aber es wird vermutet, dass es über andere Rezeptoren als die des Melatonins wirkt. Die Studie zeigt, dass Bromomelatonin-Derivate Potential für die zukünftige Behandlung zur Vorbeugung von Knochenerkrankungen besitzen [51].

Um nun die Mechanismen der Einflüsse von Melatonin auf den Knochenumbau besser zu verstehen, ist ein genaues, quantitatives Verständnis des direkten Einflusses von Melatonin auf die Knochenzellen notwendig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher der Einfluss von Melatonin auf das Wachstum von murinen OC in vitro untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass Melatonin das OC-Wachstum in hohen Konzentrationen verstärkt, während niedrige, Rezeptor-vermittelte Konzentrationen die OC-Genese reduzieren.

3. ZIELE

Der Knochen unterliegt einem ständigen Umbau, welcher durch die Knochenzellen gesteuert wird. OB sind für den Aufbau-, während OC für den Abbau des Knochens verantwortlich sind [3]. Beim Gesunden besteht ein Gleichgewicht zwischen diesen beiden Vorgängen. Ist dieses Gleichgewicht jedoch gestört, können verschiedene Krankheiten auftreten.

Melatonin, ein Derivat der Aminosäure Tryptophan [19], ist für seine zahlreichen physiologischen Wirkungen bekannt. Dazu zählen die Kontrolle der zirkadianen Rhythmen, zu denen auch der Schlaf-Wachrhythmus gehört, des Körpergewichtes, des Alterungsprozesses etc., aber auch seine Fähigkeit als Antioxidans zu wirken [20]. Da mit zunehmendem Alter die Produktion von Melatonin sinkt, wird ein Zusammenhang zwischen der Melatoninkonzentration im Körper und verschiedenen altersbedingten Krankheiten, wie z.B. Osteoporose, vermutet [45].

Hohe Melatonin-Konzentrationen sind im Knochenmark zu finden. Außerdem unterliegt der Knochenstoffwechsel einem 24-Stunden-Rhythmus, was auf einen Einfluss von Melatonin auf die Knochenzellen schließen lässt [46].

Weiters weisen zahlreiche Studien einen direkten Einfluss von Melatonin auf die Knochenzellen nach [45].

Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit der Einfluss von Melatonin auf das Osteoklasten-Wachstum untersucht und mit Hilfe einer neuartigen OC-Analyse-Software [52] genau quantifiziert werden.

Im Rahmen der Arbeit wurden folgende vier Ziele verfolgt:

- 1) Optimierung einer Osteoklasten-Zellkultur
- 2) Quantifizierung der kultivierten OC mittels TRAP-Färbung
- 3) Quantifizierung der Osteoklasten mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen bestimmter Markerproteine
- 4) Quantifizierung der Expression von MT₁ Protein in Osteoklasten oder Vorläuferzellen auf mRNA Ebene

ad 1) Optimierung einer OC-Zellkultur

Um ein optimales Zell- und OC-Wachstum zu erreichen, sollen verschiedene Kultur-Bedingungen und Zusätze getestet werden.

ad 2) Quantifizierung der kultivierten Osteoklasten mittels TRAP-Färbung

Die TRAP-Färbung stellt eine klassische Methode zur Quantifizierung von OC dar. Um die Effizienz und Genauigkeit dieser Methode mit der neu entwickelten Analyse-Software zu vergleichen, sollen OC und nicht-OC manuell unter einem Lichtmikroskop ausgezählt werden.

ad 3) Quantifizierung der Osteoklasten mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen bestimmter Markerproteine

- a) Detektion von Osteoklasten und deren Vorläuferzellen mithilfe einer automatischen Quantifizierungs-Software

Da im Rahmen eines interdisziplinären Projektes zwischen der Firma TissueGnostics GmbH und der MedUni Wien sollte eine Software zur automatischen Erkennung und Quantifizierung von Osteoklasten in einer Zellkultur entwickelt und evaluiert werden (Heindl et al., unveröffentlichte Daten). Diese soll die automatische Quantifizierung von OC und , aber auch anderen mehrkernigen Zellen in gemischten Kulturen ermöglichen

- b) Qualitative Analyse des Melatonin-Rezeptors MT₁

In einem Vorversuch soll das Vorkommen und die Lokalisation des Melatonin-Rezeptors MT₁ untersucht werden.

ad 4) Die mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Färbung festgestellte Expression von MT₁ Protein in Osteoklasten oder Vorläuferzellen soll auf mRNA Ebene bestätigt und quantifiziert werden.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1 Gewinnung von OC-Vorläuferzellen aus Maus-Knochenmark

Geräte

- CO₂-Gasflasche mit CO₂-Kammer (Messer Medical)
- Laminar Air Flow
-

Materialien und Reagentien

- Alkohol 70 %
- Maus
- Nabelschnurklemme
- Pinzette
- Schere
- Spritze (NormJect®, 12 ml)
- Spritzennadel (FineJect®)
- Styroporplatte
- Zellkulturmedium (Gibco), plus:
 - o 10 % FCS-Gold, hitzeinaktiviert
 - o 1 % PenStrep (Penicillin-Streptomycin, Gibco)
- 0.1 % Fungizone (Amphotericin B, Gibco) Zentrifugenröhrchen 50 ml (TPP)

4.1.1 Präparieren der großen Röhrenknochen

Die Maus wird durch CO₂-Begasung und anschließende zervikale Dislokation getötet und mithilfe von Nadeln auf einer Styroporplatte fixiert. Um die Kontaminationsgefahr möglichst gering zu halten, wird die Maus mit 70 %-igem Alkohol gründlich abgespült. Anschließend wird das Fell der Hinterbeine großflächig abgezogen. Um das Arbeiten zu erleichtern, wird das Bein mit einer Nabelschnurklemme fixiert. Muskeln und Gewebe werden so gut wie möglich von den Knochen entfernt. Danach erfolgt die Abtrennung des Oberschenkels vom Becken. Femur und Tibia werden durch Auseinanderschneiden am Kniegelenk getrennt und vollständig vom umgebenden Muskelgewebe gereinigt.

4.1.2 Ausspülen des Knochenmarks

Um eine Kontamination des Knochenmarks zu vermeiden, werden die weiteren Arbeitsschritte im Laminar Air Flow durchgeführt. Zu Beginn muss der Arbeitsplatz vorbereitet werden, indem die Arbeitsfläche gründlich mit 70 %-igem Alkohol abgewaschen wird, und alle benötigten Utensilien, dazu zählen die isolierten Knochen, Spritze, Nadel, Pinzette, Schere, Zellkulturmedium und ein 50 ml Zentrifugenröhrchen, bereitgestellt werden. Es ist darauf zu achten, dass bei Arbeiten mit Zellkulturen immer Handschuhe getragen werden müssen, diese werden ebenfalls vor Arbeitsbeginn mit Alkohol abgespült und in der Laminar Flow trocknen gelassen.

Zuerst werden 10 ml Medium in die Spritze aufgesaugt. Danach werden die Enden der Knochen mit einer Schere abgeschnitten, um den Knochenmarkskanal freizulegen. Mithilfe einer dünnen Nadel wird nun jeder der insgesamt vier Knochen mit jeweils 2,5 ml Medium durchspült. Die entstehende Zellsuspension sammelt man in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen.

4.2 Anlegen einer OC-Zellkultur

4.2.1 Vorbereitung

Sterilisation der Deckgläser

Geräte

- Heizplatte (Liebisch)
- Trockenschrank (WTCbinder)

Materialien und Reagentien

- Deckgläser rund, 12 mm (Carl Roth)
- Aceton (Fisher Scientific)
- Alkohol 96 % (AKH Anstaltsapotheke)
- Alufolie
- Sterilindikatorband

Durchführung

Die Deckgläser werden in einem Becherglas mit Aceton bedeckt. Dieses wird durch Erwärmen auf 60 °C auf einer Heizplatte abgedampft. Daraufhin werden die Deckgläser mit 96 %-igem Alkohol, welcher ebenfalls abgedampft wird, übergossen. Danach wird das Becherglas mit Alufolie verschlossen, mit einem Sterilindikatorband versehen und mindestens 4 Stunden bei 150 °C im Trockenschrank sterilisiert.

Zellen zählen mithilfe eines Zellzählgerätes

Geräte

- Coulter Counter (Beckmann)

Materialien und Reagentien

- Coulter Counter Röhrchen (Beckmann)
- Isotone Pufferlösung (Fisher Scientific)
- Zellsuspension
- Reinigungslösung (Beckmann)

In der Zellsuspension befindet sich eine unbekannte Anzahl an Zellen. Da sich 1 Millionen Zellen pro cm^2 für eine erfolgreiche OC-Kultur etabliert haben, müssen die Zellen vorher gezählt werden. Dazu verwendet man einen Coulter Counter.

Prinzip

Durch Messung der Änderung der elektrischen Ladung ist der Coulter Counter in der Lage die Anzahl der Zellen zu bestimmen:

Zunächst müssen die Zellen in einer Elektrolytlösung suspendiert werden. Eine Kapillare mit einer kleinen Öffnung taucht in die Lösung ein. Das Gerät besitzt zwei Elektroden. Eine befindet sich innerhalb der Kapillare, die andere außerhalb. Die Partikel in der Elektrolytlösung werden nun durch die Öffnung der Kapillare gesaugt. Dadurch kommt es zur kurzzeitigen Änderung des Stromflusses, welche gemessen werden kann.

Durchführung

Zunächst werden in einem Coulter Counter Röhrchen 100 µl der Zellsuspension mit 10 ml isotonem Puffer gemischt. Danach wird das Röhrchen in die Maschine gestellt und das Gerät gestartet. Drei Zählungen werden automatisch durchgeführt. Das daraus erhaltene Ergebnis ist die Zellzahl pro ml.

Um die Elektroden vor dem Austrocknen und die Schläuche vor Verunreinigungen zu bewahren, muss das Gerät nach dem Arbeiten mit einer Reinigungslösung, welche einen isotonen Puffer und ein Reinigungsmittel enthält, gespült werden.

Herstellung des Nährmediums

Geräte

- Laminar Air Flow
- Wasserbad 37 °C (GFL Gesellschaft für Labortechnik)

Materialien und Reagentien

- Nährmedium α MEM- Medium ohne Nucleoside (Gibco), plus:
 - o 10 % FCS-Gold, hitzeinaktiviert
 - o 1 % PenStrep (Penicillin-Streptomycin, Gibco)
 - o 0.1 % Fungizone (Amphotericin B, Gibco)
- RANKL (PeproTech)
- M-CSF (R&D-Systems)
- Melatonin (Calbiochem)
- DMSO (Sigma)

Dem Nährmedium fügt man im Laminar Air Flow 10 % fetales Kälberserum, sowie 0,1 % Fungizide und 1 % Antibiotika zu, um das Wachstum von nicht-Säugetierzellen zu unterbinden. Bevor mit dem Medium gearbeitet werden kann, muss es im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt werden.

Anschließend werden dem Medium noch die Wachstumsfaktoren RANKL und M-CSF in einer Konzentration von 25 ng / ml (RANKL) und 15 ng / ml (M-CSF) zugefügt, um das OC-Wachstum zu stimulieren. Weiters können noch andere

Substanzen, wie Melatonin und DMSO, die das Wachstum beeinflussen, zugesetzt werden.

4.2.2 Durchführung

Geräte

- Laminar Air Flow
- Brutschrank (Thermo Fisher)

Materialien und Reagentien

- Zellkulturplatten
 - o 6-Well Platte (TPP)
 - o 24-Well Platte (TPP)
 - o 48-Well Platte (Falcon)
- Pipetten (Denville)
- Deckgläser (behandelt wie unter 4.2.1 beschrieben)
- Zellsuspension (hergestellt wie oben beschrieben)
- Nährmedium (hergestellt wie oben beschrieben)

Die Arbeiten werden im Laminar Air Flow durchgeführt.

Die zuvor gezählte Zellsuspension wird mit Medium verdünnt, um die gewünschte Zellzahl pro Well zu erhalten. und in jedes Well der Zellkulturplatte wird jeweils ein Deckglas gelegt. Danach wird die der gewünschten Zellzahl entsprechende Menge der vorbereiteten Zellsuspension in jedes Well pipettiert.

Die fertige Platte wird für eine Woche in einem Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert, wobei das Medium alle zwei Tage gewechselt wird (siehe unten).

4.2.3 Wechseln des Mediums

Geräte

- Laminar Air Flow
- Wasserbad 37 °C (GFL Gesellschaft für Labortechnik)
- Sauger

Materialien und Reagentien

- Nährmedium α MEM- Medium ohne Nucleoside (Gibco), plus:
 - o 10 % FCS-Gold, hitzeinaktiviert
 - o 1 % PenStrep (Penicillin-Streptomycin, Gibco)
 - o 0.1 % Fungizone (Amphotericin B, Gibco)
- RANKL (PeproTech)
- M-CSF (R&D-Systems)
- Melatonin (Calbiochem)
- DMSO (Sigma)
- Sterile Pasteurpipette

Zunächst muss das Medium im Wasserbad auf 37 °C erwärmt werden. Danach werden die für die Kultur benötigten Wachstumsfaktoren und Substanzen in der Laminar Air Flow zugefügt (siehe 4.2.1). Anschließend wird mit einer sterilen Pasteurpipette das verbrauchte Nährmedium aus den Wells der Platte abgesaugt und die entsprechende Menge des neu bereiteten Nährmediums zugefügt. Danach wird die Kulturplatte wieder in den Brutschrank gestellt.

4.3 RNA-Isolierung aus Maus-OC

4.3.1 Prinzip

Die Isolierung der RNA wurde nach dem peqGOLD TriFastTM Standardprotokoll durchgeführt [53].

Um das Vorkommen von spezifischer mRNA nachzuweisen, ist es notwendig, die Gesamt-RNA aus einer OC-Zellkultur zu isolieren.

Bei der Handhabung von RNA ist darauf zu achten, dass diese sehr instabil und anfällig für Zerstörung durch RNasen ist. Aus diesem Grund bedarf der Umgang mit RNA großer Sorgfalt. Einweghandschuhe, RNase-freie Pipetten- und Spitzen sowie die Verwendung von RNase-freiem Wasser sind Voraussetzungen für ein erfolgreiches Arbeiten.

Um die RNA aus den OC zu isolieren, werden die Zellen zunächst mit peqGOLD Trifast™ behandelt. Dieses Reagens inaktiviert die RNasen und extrahiert gleichzeitig die RNA aus den Zellen. In peqGOLD Trifast™ sind die gefährlichen Stoffe Phenol und Guanidinisothiocyanat enthalten, weshalb beim Arbeiten besondere Vorsicht geboten ist. Nach der Bearbeitung mit Trifast wird Chloroform zugegeben und zentrifugiert. Es bilden sich drei Phasen. Die wässrige Phase enthält die RNA, welche abpipettiert und anschließend mit Isopropanol ausgefällt wird.

Danach wird zwei Mal mit Alkohol gewaschen und die fertig isolierte und gereinigte Gesamt-RNA in PCR-Wasser gelöst.

4.3.2 Durchführung

Geräte

- Heizblock (Eppendorf)
- Vortexer (Labinco)
- Zentrifuge (Eppendorf)

Materialien und Reagentien

- Box mit Eis
- Papiertücher
- DNase, RNase, DNA freie Röhrchen, 1,5 ml (Biozym)
- DNase, RNase, DNA freie Pipettenspitzen (Biozym)
- Handschuhe (Gentleskin)
- peqGOLD Trifast™ (peqLAB)
- Chloroform (Merck)
- Isopropanol (Merck)
- Alkohol, 70 %
- DNase, RNase freies Wasser, „PCR Wasser“ (Gibco)

1. Homogenisierung

PeqGOLD Trifast™ (1 ml / 10 cm²) wird direkt in die jeweiligen Wells pipettiert. Durch oftmaliges Aufziehen mit der Pipette werden die Zellen lysiert und danach in

ein Röhrchen übertragen. Danach wird das Röhrchen 5 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen gelassen.

2. Isolierung der RNA

Die weiteren Schritte werden in einer RNase-freien Werkbank durchgeführt.

Der Probe werden 200 µl Chloroform zugesetzt, danach wird sie 15 Sekunden gevortext und anschließend 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Um die Phasen gründlich zu trennen, wird die Probe 15 Minuten lang zentrifugiert ($12\,000 \times g$, 4 °C). Dabei entstehen drei Phasen: die untere organische Phase enthält die DNA, die Interphase beinhaltet Proteine und in der wässrigen oberen Phase befindet sich die RNA. Letztere wird vorsichtig in ein neues Röhrchen abpipettiert und nochmals für 15 Minuten zentrifugiert, um sicherzustellen, dass keine organischen Verunreinigungen in die wässrige Phase gelangt sind.

3. Ausfällung der RNA

In ein frisches Röhrchen werden 500 µl Isopropanol gegeben. In dieses wird nun die wässrige Phase übertragen. Das Röhrchen wird kurz gevortext und, um eine vollständige Ausfällung der RNA zu erreichen, 10 Minuten auf Eis stehen gelassen. Im folgenden Schritt wird 15 Minuten zentrifugiert und danach das Isopropanol vom entstandenen Pellet abpipettiert.

4. Waschen der RNA

Das Pellet wird mit 70 %-igem Alkohol gewaschen. Hierfür wird 1 ml 70 %-iger Alkohol zugeführt, 10 Minuten zentrifugiert und der Alkohol wieder abdekantiert. Dieser Vorgang wird zwei Mal durchgeführt. Beim zweiten Durchgang muss darauf geachtet werden, dass der Alkohol vollständig vom Pellet entfernt wird.

5. Lösen der RNA

Das Pellet wird ca. 2 Minuten im Heizblock bei 55 °C getrocknet und anschließend in 20 µl PCR-Wasser gelöst. Nachdem die gelöste RNA für 5 Minuten bei 55 °C inkubiert wurde, kann sie bei -80 °C aufbewahrt werden.

4.4 Bestimmung der Menge und Reinheit der isolierten RNA

Die Menge der isolierten RNA wird mithilfe von UV/VIS Spektrophotometrie bestimmt. Das Verhältnis der Absorption der Proben bei 260 nm und 280 nm (A_{260} / A_{280}) ist ein Maß für die Reinheit der RNA. Die PeqGOLD Trifast™ Arbeitsanleitung setzt einen erreichbaren A_{260}/A_{280} Quotienten von 1,6 - 2,0 fest.

Geräte

- Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific)

Materialien und Reagentien

- 10 µl PCR-Wasser zum Einstellen des Blindwertes (Gibco)
- DNase, RNase, DNA freie Pipettenspitzen (Biozym)
- Papiertücher
- Box mit Eis

Durchführung

Die Vermessung erfolgt gemäß Betriebsanleitung des Spektrophotometers.

4.5 Agarose Gel-Elektrophorese (GE)

Die Untersuchung der Integrität von RNA, als auch die Analyse von PCR Produkten wird mithilfe von Agarose GE durchgeführt. Bei dieser Methode werden Nukleinsäurestränge nach ihrer Größe getrennt. Die Proben werden in die Taschen eines Gels gefüllt, welches sich in einer Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Pufferlösung befindet. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die negativ geladenen Nucleinsäure-Moleküle Richtung Anode. Dabei laufen kleine Moleküle schneller als große durch das Gel, was die genannte Auftrennung der Stränge nach ihrer Größe bewirkt.

Um die entstehenden Banden sichtbar zu machen, enthält das Gel einen Farbstoff (z.B. Gel-Red), der mit der RNA bzw. DNA interkaliert. Unter UV-Licht kann das Gel betrachtet werden.

Wenn die RNA intakt ist, erscheinen 2 Banden für die 28S und 18S rRNA (ribosomale RNA).

4.5.1 Herstellung von Puffer und Lösungen

0,5M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung

Geräte

- Magnetrührer (Framo®-Gerätetechnik)
- pH-Meter (Metrohm)

Materialien und Reagentien

- Aqua bidest
- EDTA, Na-Salz (Merck)
- HCl (Merck)
- NaOH (Merck)

Durchführung

93,05 g EDTA, Na-Salz werden in 400 ml aqua bidest. gelöst. Danach wird der pH mit HCl oder NaOH unter Zuhilfenahme eines pH-Meters auf 8 eingestellt. Anschließend füllt man mit aqua bidest. auf 500 ml auf. Die fertige Lösung kann bei Raumtemperatur gelagert werden.

TAE-Stammlösung (50x)

Geräte

- Magnetrührer (Framo®-Gerätetechnik)
- pH-Meter (Metrohm)

Materialien und Reagentien

- 0,5 M EDTA-Lösung (siehe oben)
- Aqua bidest
- Eisessig (Merck)

Durchführung

Zunächst werden 242 g Tris in 750 ml aqua bidest. gelöst. Anschließend werden 57,1 ml Eisessig sowie 100 ml 0,5 M EDTA-Lösung zugefügt. Mit aqua bidest. wird

auf ein Volumen von 1000 ml aufgefüllt. Die fertige Lösung kann bei Raumtemperatur gelagert werden.

1x TAE-Lösung

Materialien und Reagentien

- Aqua bidest.
- TAE-Stammlösung (50x; siehe oben)

Durchführung

Ein Teil der TAE-Stammlösung (50x) wird mit 49 Teilen aqua bidest. (1 : 50) verdünnt. Die fertige Lösung kann bei Raumtemperatur gelagert werden.

6x Lade-Puffer

Materialien und Reagentien

- Bromphenolblau (Amresco)
- Glycerol (Merck)
- PCR Wasser (Gibco)
- Xylen Cyanol FF (Amresco)

Durchführung

0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylen Cyanol FF, 30 % (v/v) Glycerol und 69,5 % (v/v) PCR Wasser werden gemischt. Anschließend wird die fertige Lösung aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

4.5.2 Herstellung des Agarose-Gels

Geräte

- Gelelektrophorese- (GE)-apparatur (Peqlab)
- Magnetrührer (Framo®-Gerätetechnik)
- Mikrowelle (Monlinex)

Materialien und Reagentien

- Agarose (Invitrogen)
- Aqua bidest.

- Gel-Red (Biotium)

Für die verwendete Apparatur werden 175 ml Gel gegossen. Da ein 2 %-iges Gel verwendet wird, werden 3,5 g Agarose langsam unter Rühren am Magnetrührer in 175 ml TAE-Puffer gemischt. Danach wird das Gel in der Mikrowelle kurz aufgeköcht, geschwenkt und nochmals erwärmt, bis es klar ist. Anschließend wird das Gel unter Rühren bis zur Handwärme erkalten gelassen, 17,5 µl Farbstoff zugefügt und in die GE-Kammer gegossen.

4.5.3 Gel-Elektrophorese (GE)

Geräte

- GE-Kammer (Peqlab)
- GE-Stromquelle (Peqlab)
- Bildgebender UV-Transilluminator (Biorad)

Materialien und Reagentien

- 2 % Agarosegel (siehe 4.5.2)
- Handschuhe (Gentleskin)
- DNase, RNase, DNA freie Zentrifugenröhrchen 1,5 ml (Biozym)
- DNase, RNase, DNA freie Pipettenspitzen (Biozym)
- DNase, RNase freies Wasser, "PCR-Wasser" (Gibco)
- 6x Lade-Puffer (siehe 4.5.1)
- sterile 96-Well Platte (Greiner Labortechnik)
- Standard (Gene Ruler 100 bp plus DNA Ladder)

1. Gel-Elektrophorese

Entsprechend der Taschengröße des Gels wird ein aliquoter Teil der Probe mit einem Sechstel des Gesamtvolumens an Lade-Puffer in einer 96-Well Platte vermischt. Nachdem das Gel in die Pufferlösung gelegt wurde, werden die Taschen des Gels mit der vorbereiteten Probe befüllt. Im Falle von DNA-Proben ist auch die Verwendung eines Standards erforderlich, welcher DNA-Fragmente bekannter Größe enthält, was einen Vergleich von dessen Banden mit denen der Probe ermöglicht. So lässt sich die Größe der Proben-Moleküle abschätzen. Die

Elektroden werden angeschlossen und das Gel je nach gewünschter Laufstrecke laufen gelassen. Standard Einstellung: 180 V, 1 Stunde.

2. Analyse des Gels

Die Analyse wurde mit dem GEL LOGIC 2200 Imaging System durchgeführt. Zuerst wird das Gel in das Gerät gelegt. Danach wird das Programm „Carestream MI MS“ geöffnet. Es wird auf „Capture GL2200“ und dann auf „Preview“ geklickt. Danach wird „Epi-white“ auf dem Gerät aktiviert und das Gel gerade gerichtet. Als nächstes wird der Deckel geschlossen, „UV“ aktiviert und auf „Done“ geklickt. Jetzt muss eine optimale Belichtungszeit eingestellt werden. Um das Bild aufzunehmen wird auf „Expose“ gedrückt. Anschließend kann das aufgenommene Bild ausgedruckt oder gespeichert werden. Zum Schluss wird das Programm geschlossen und das Gerät gesäubert.

4.6 Reverse Transkription der isolierten RNA

4.6.1 Prinzip

Da sich die RNA nicht für eine PCR eignet, muss sie zunächst in die DNA umgeschrieben werden. Dies geschieht mithilfe der reversen Transkriptase, eines Enzymes, welches die Umwandlung der RNA in eine komplementäre, einsträngige DNA (cDNA) katalysiert. Die cDNA kann nun als Ausgangsmaterial für eine PCR verwendet werden.

Für die Durchführung der reversen Transkription (RT) werden random Primer, welche die DNA-Synthese einleiten, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) zur Synthese der DNA-Stränge, ein spezifischer Puffer, RNase-Inhibitor sowie die reverse Transkriptase selbst benötigt. Alle Komponenten werden in einem Mastermix zusammengemischt, welcher dann den Proben zugesetzt wird.

4.6.2 Durchführung

Geräte

- Thermal cycler (Eppendorf)

- Vortexer (Labinco)

Materialien und Reagentien

- -20 °C Lagerbox (für Reverse Transkriptase und RNA se-Inhibitor)
- Box mit Eis
- DNase, RNase, DNA freies Wasser, "PCR-Wasser" (Gibco)
- DNase, RNase, DNA freie Pipettenspitzen (Biozym)
- DNase, RNase, DNA freie Zentrifugenröhrchen mit flachem Deckel 0.5 ml (Biozym)
- DNase, RNase, DNA freie Zentrifugenröhrchen mit flachem Deckel 0.2 ml (Biozym)
- Latex Handschuhe (Gentleskin)
- RT Kit (Applied Biosystems, "High capacity cDNA reverse transcription kit"), enthält:
 - o 10x RT buffer
 - o 10x RT random primer
 - o 25x dNTP Mix (100 mM)
 - o Multiscribe™ Reverse Transcriptase 50 U / µL
 - o RNase Inhibitor

1. Herstellung von 10 µl des RT 2x Mastermix (pro 20 µl Reaktion)

Es ist darauf zu achten, dass die verwendeten Reagentien und Enzyme immer auf Eis gelagert werden.

Zuerst müssen die notwendigen Mengen an Reagentien für die Anzahl an Proben plus eine weitere, um Pipettierfehler auszugleichen, ausgerechnet werden. Danach wird der RT 2x Mastermix laut Tabelle 2 in einem 0,5 ml Zentrifugenröhrchen zusammengemischt. Die Enzyme sollen erst zum Schluss aus dem Gefrierschrank genommen und zugesetzt werden. Anschließend wird der fertige Mastermix kurz gevortext.

Tabelle 2: Komponenten für den RT 2x Mastermix

Vol [μ l]	Komponente
2,0	10x RT buffer (RT kit)
0,8	10x dNTP mix (RT kit)
20	10x RT random primers (RT kit)
3.2	PCR water
1.0	Reverse transcriptase (RT kit)
1.0	RNase inhibitor (RT kit)

2. Herstellung der Proben

Man überführt einen aliquoten Teil der RNA-Proben, welche jeweils 2000 ng RNA enthalten, in ein 0,2 ml Zentrifugenröhrchen mit flachem Deckel. Als nächstes wird mit PCR-Wasser auf ein Volumen von 10 μ l aufgefüllt. Danach werden 10 μ l des zuvor bereiteten Mastermix zugegeben und ein paar Mal auf und ab pipettiert, um die Proben durchzumischen.

3. Durchführung der RT

Die vorbereiteten Proben werden in den Thermocycler gestellt und nach dem folgenden Temperaturprogramm (siehe Tabelle 3) behandelt.

Tabelle 3: Temperaturprogramm für die RT

Schritt	Zeit	T [$^{\circ}$ C]
1	10 min	25
2	120 min	37
3	5 sec	85
4	Halten	4

Nach Beendigung des Programms kann die cDNA bei -20 $^{\circ}$ C gelagert werden.

4.7 PCR – Polymerase Ketten Reaktion

4.7.1 Prinzip

Mithilfe der PCR ist es möglich, bekannte (c)DNA-Sequenzen zu vervielfältigen.

Somit können z.B. Erbkrankheiten erkannt, genetische Fingerabdrücke hergestellt oder Gene kloniert werden.

Zur Durchführung einer PCR werden zunächst ein Template, welches den gewünschten DNA-Abschnitt enthält, sowie zwei Primer, die als Startpunkte der DNA-Synthese dienen, benötigt. Außerdem sind die Taq-Polymerase, ein Enzym, welches die gewünschte Sequenz vervielfältigt, und Magnesium, welches das Andocken der Primer an den zu vervielfältigenden Strängen begünstigt, erforderlich. Ebenso sind dNTPs als Bausteine für die neuen DNA-Stränge, und eine Pufferlösung, um eine entsprechende chemische Umgebung herzustellen, notwendig.

Die eigentliche PCR erfolgt in einem Thermocycler, welcher die Temperatur entsprechend der verschiedenen Phasen der Amplifikation ändert.

Zuerst wird die Probe auf 94–96 °C erhitzt, um die doppelsträngige DNA zu denaturieren. Daraus resultieren zwei Einzelstränge. Danach erfolgt eine Abkühlung auf 50–60 °C, wodurch sich die Primer an die komplementären Sequenzen der DNA anlagern. Die genaue Temperatur ist abhängig von den verwendeten Primern. Ist die Temperatur zu niedrig, ist es möglich, dass sich die Primer an unspezifische Sequenzen anlagern, was in falschen Produkten resultiert. Wenn die Temperatur zu hoch ist, können sich die Primer nicht anlagern. Letztendlich erfolgt die Elongation bei 72 °C. Bei diesem Schritt amplifiziert die Taq-Polymerase die DNA-Sequenzen.

Durch Wiederholen der einzelnen Phasen, Denaturierung, Hybridisierung und Elongation, lassen sich die gewünschten DNA-Sequenzen rasch exponentiell vervielfältigen.

Mithilfe der Agarose GE kann nun das PCR-Produkt identifiziert werden.

Um sicherzugehen, dass das Ergebnis der PCR richtig interpretiert wurde, sollten verschiedene Typen von Kontroll-Proben in die PCR eingebracht werden. Dazu

zählt zunächst eine Negativkontrolle, welche nur den Mastermix und Wasser enthält. Damit kann ausgeschlossen werden, dass eine eventuell entstandene Bande in einer Probe durch eine Verunreinigung eines der Reagentien entstanden ist. Im Falle einer RT-PCR sollte weiters eine RNA-Probe, welche nicht revers transkribiert wurde, miteinbezogen werden. Somit kann eine Amplifikation genomischer DNA ausgeschlossen werden. Letztendlich kann auch eine Positivkontrolle, welche die gewünschte DNA sicher enthält, durchgeführt werden.

4.7.2 Durchführung

Geräte

- Thermal cycler (Eppendorf)
- Vortexer (Labinco)

Materialien und Reagentien

- -20 °C Lagerbox (für Reverse Transkriptase und RNA se-Inhibitor)
- Box mit Eis
- DNase, RNase, DNA freies Wasser, "PCR-Wasser" (Gibco)
- DNase, RNase, DNA freie Pipettenspitzen (Biozym)
- DNase, RNase, DNA freie Zentrifugenröhrchen mit gewölbtem Deckel 0.2 ml (Biozym)
- DNase, RNase, DNA freie Zentrifugenröhrchen, 1,5 ml (Biozym)
- Forward und Reverse Primer
- Latex Handschuhe (Gentleskin)
- 10 mM dNTP Mix (Fermentas)
- Taq-Polymerase (Fermentas), geliefert mit:
 - o 10x PCR buffer with KCl
 - o 25 mM MgCl₂

Primer für β -Actin

Die Sequenzen der Primer für die β -Actin PCR wurden aus "Gene structures, biochemical characterization and distribution of rat melatonin receptors", Ishii et al., J Physiol Sci (2009) 59:37-47 verwendet [54].

Hierbei handelt es sich zwar um Ratten-Primer, allerdings konnte deren Funktion auch mit Maus Proben nachgewiesen werden (Schepelmann und Pichler, 2010, unveröffentlichte Daten)

Tabelle 4: β -Actin PCR Primer nach Ishii et al. [54]

Name	Sequenz	Produktgröße
β -Actin vorwärts	5'-GTCCACACCCGCCACCAGT-3'	496 bp
β -Actin rückwärts	5'-CGTCTCCGGAGTCCATCACAAT-3'	496 bp

1. Herstellung des PCR 2x Mastermix

Es ist darauf zu achten, dass die verwendeten Reagentien und Enzyme immer auf Eis gelagert werden.

Zuerst müssen die notwendigen Mengen an Reagentien für die Anzahl an Proben plus 1 ausgerechnet werden. Danach wird der PCR 2x Mastermix laut nachstehender Tabelle (siehe Tabelle 5) zusammengemischt. Die Enzyme sollen erst zum Schluss aus dem Gefrierschrank genommen und zugesetzt werden. Anschließend wird der fertige Mastermix kurz gevortext.

Tabelle 5: Komponenten für 12,5 μ l 2x Mastermix (pro Probe)

Konz.	Vol [μ l]	Komponente
0,2 mM	0,5	10 mM dNTP
0,2 μ M	0,05	vorwärts Primer
0,2 μ M	0,05	rückwärts Primer
	2,5	10x Puffer mit KCl
1,5 mM	1,5	25 mM MgCl ₂
	6,9	PCR Wasser
1U	1,0	Taq-Polymerase

2. Herstellung der Proben

Ein aliquoter Teil der cDNA-Proben, welcher die gewünschte Menge entsprechender RNA enthält, wird in ein 0,2 ml Zentrifugenröhrchen mit gewölbtem Deckel überführt. Die genaue Menge wird nach Erfahrungswerten

ermittelt und beträgt zwischen 10 und 1000 ng. Als nächstes wird mit PCR-Wasser auf ein Volumen von 12,5 µl aufgefüllt. Danach werden 12,5 µl des zuvor bereiteten Mastermix zugegeben und ein paar Mal auf und ab pipettiert, um die Proben durchzumischen. Außerdem wird eine Negativkontrolle, welche nur den Mastermix und Wasser enthält, sowie im Falle einer RT-PCR eine RNA-Probe, welche nicht revers transkribiert wurde, hergestellt.

3. Durchführung der PCR

Die vorbereiteten Proben werden in den Thermocycler gestellt und nach dem folgenden Temperaturprogramm (siehe Tabelle 6) behandelt.

Tabelle 6: Temperaturprogramm für die PCR

Schritt	Zyklen	Zeit	T [°C]
1	1	2 min	95
2		30 sec	95
3	40	20 sec	60
4		30 sec	72
5	1	5 min	72
6	1	Hold	4

Nach Beendigung des Programms kann das Produkt bei -20 °C gelagert werden.

4.8 Real time PCR (qPCR)

4.8.1 Prinzip

Die Real-time PCR, auch quantitative PCR (PCR) genannt, ist eine Methode um die Menge eines während der PCR entstehenden Produktes und damit die Ausgangsmenge der DNA bzw. cDNA zu messen. Diese Quantifizierung erfolgt durch Messung der Fluoreszenz in der Probe. Diese nimmt proportional zur Menge des PCR-Produktes zu, was durch DNA-Farbstoffe erreicht wird. Dabei differenziert man zwischen interkalierenden Farbstoffen, welche sich in die DNA einlagern, und Farbstoffen, die an eine Sonde gebunden sind. Diese Sonde

enthält an einem Ende einen Quencher, am anderen den Fluoreszenzfarbstoff. Während der PCR wird die Sonde durch eine Polymerase mit 5'-3'-Aktivität abgebaut, wodurch sich Quencher und Farbstoff voneinander entfernen, was in einer Fluoreszenzzunahme resultiert. Dieser Fluoreszenz-Anstieg kann mithilfe von Photodioden im PCR Gerät gemessen werden.

Die Berechnung der DNA-Menge kann nun auf verschiedene Weisen durchgeführt werden, wobei meist der ΔCT -Wert ermittelt wird. Der CT (cycle threshold)-Wert gibt die Anzahl der PCR-Zyklen an, die notwendig sind, bis die Fluoreszenz in einer Probe stark genug ist, um sie zu detektieren. Er beschreibt also den Zyklus, bei dem die Fluoreszenz der Probe erstmals deutlich über der des Hintergrundes steigt. Um signifikante Ergebnisse zu erhalten, wird ein CT-Wert unter 35 angestrebt. Der ΔCT -Wert charakterisiert nun den Unterschied zwischen dem CT-Wert der gewünschten Ziel-DNA und dem eines Standard-Gens (z.B. β -Actin). Um den ΔCT -Wert zu erhalten, subtrahiert man also die beiden CT-Werte voneinander. Der erhaltene ΔCT -Wert wird für die n-fache Expression (E_n) in folgende Gleichung eingesetzt: $E_n = 2^{-\Delta CT}$

Wird der ΔCT -Wert mit anderen CT-Werten verglichen, erhält man den $\Delta\Delta CT$ -Wert. Mithilfe dieses Wertes können Unterschiede der Genexpression zwischen 2 Gruppen von Proben (z.B. Placebo- gegen Verum-Gruppe) verglichen werden. Hierfür subtrahiert man die beiden ΔCT -Werte und setzt in folgende Gleichung ein: $E_n = 2^{-\Delta\Delta CT}$, wobei E_n den n-fachen Expressionsunterschied zwischen den beiden Gruppen angibt.

Voraussetzung für diese Methode ist die gleiche Expressions-Effizienz der beiden PCR-Reaktionen.

Zur Erhöhung der Aussagekraft und Genauigkeit dieser Methode, soll jede Probe mindestens zwei Mal, besser drei Mal, vorliegen und vermessen werden. Außerdem sollen Blind- und -RT-Proben, also RNA-Proben, welche nicht revers transkribiert wurden, mit eingebracht werden.

4.8.2 Durchführung

Geräte

- StepOnePlus™ Real Time PCR System with Tower Computer (Applied Biosystems)
- Zentrifuge (Sigma)
- Vortexer (Labinco)

Materialien und Reagentien

- Box mit Eis
- DNase, RNase, DNA freies destilliertes Wasser, "PCR Wasser" (Gibco)
- DNase, RNase, DNA freie Pipettenspitzen (Biozym)
- DNase, RNase, DNA freie Röhrchen mit flachem Verschluss 0.2 ml (Biozym)
- Fast 96-well reaction plate 0.1 ml (Applied Biosystems)
- Handschuhe (Gentleskin)
- MicroAmp™ Optical Adhesive Film (Applied Biosystems)
- Taq-Man® Gene Expression Assay(s) (20x Mix; siehe Tabelle 8)
- Taq-Man® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)

Vorbereitung

Zunächst werden Proben, gewünschte Ziel-Sequenzen und die Anzahl der Wiederholungen gewählt. Danach wird ein Plattenlayout erstellt, um spätere Pipettierfehler zu vermeiden. Ebenso muss die notwendige Menge an cDNA (plus ein Aliquot, um Pipettierfehler zu kompensieren) für die Proben berechnet werden.

Durchführung

Die Reaktionen wurden mit einem Reaktions-Volumen von 20 µl durchgeführt.

15 µl Mastermix werden laut nachstehender Tabelle (siehe Tabelle 7) für die entsprechenden Proben vorbereitet.

Tabelle 7: Komponenten für 15 µl Mastermix

Vol [µl]	Komponenten
10	TaqMan™ 2x MM
1	TaqMan™ Assay 20x
4	PCR Wasser

Tabelle 8: Gen Expressions Assays

Ziel-Gen	Assay
ACTB (β-Actin)	Maus ACTB
MT 1	Maus Mtnr1a
MT 2	Maus Mtnr1b

Anschließend werden Verdünnungen der Proben hergestellt, da die gewünschte Menge cDNA in 5 µl PCR-Wasser enthalten sein soll. Danach werden die vorbereiteten Proben, sowie die Blind- und Negativproben, in die entsprechenden Wells der optischen 96-Well Platte pipettiert. Als nächstes wird der Mastermix zugefügt. Nun wird die Platte mit einer selbstklebenden optischen Folie verschlossen. Im Anschluss wird die Platte bei 2000 x g für 1 Minute zentrifugiert und in das Real Time PCR-Gerät gestellt.

Die Real Time PCR wird laut Betriebsanleitung durchgeführt.

Nach Beendigung der PCR werden die Ergebnisse nach oben stehender Methode berechnet.

4.9 Immunfluoreszenzfärbung

4.9.1 Prinzip

Die Immunfluoreszenzfärbung ist eine Methode, um das Vorkommen und die Lokalisation von Proteinen in Geweben oder Zellen nachzuweisen. Das Prinzip beruht auf einer spezifischen Bindung eines Antikörpers an ein bestimmtes Antigen. Unter Antikörpern versteht man Proteine, welche vom Immunsystem als Antwort auf Antigene, meist Makromoleküle, gebildet werden. Um einen Antikörper

herzustellen, wird einem Wirtstier, z.B. Mäuse, Ziegen, Ratten,... das entsprechende Antigen injiziert. Daraufhin bildet dieses Antikörper, welche isoliert werden können. Diese Antikörper können verwendet werden, um das entsprechende Antigen spezifisch anzufärben, wobei zwischen der direkten und indirekten Färbung unterschieden werden kann.

Bei der indirekten Färbung bindet zunächst ein Antikörper, der sogenannte Primärantikörper, an das gewünschte Antigen. Nach dessen Bindung wird ein sogenannter Sekundärantikörper aufgebracht. Dieser ist mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt und richtet sich allgemein gegen Antikörper des Wirtes, von dem der Primärantikörper stammt. Unter UV-Licht kann die spezifische Färbung des Zielproteins im Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Bei der direkten Färbung ist der primäre Antikörper selbst mit einem Fluorophor versehen. Dieses Verfahren ist jedoch weit weniger empfindlich als das erstgenannte.

Es ist auch möglich mehrere Proteine gleichzeitig zu detektieren. Dazu werden Doppel- oder Mehrfachfärbungen durchgeführt. Man unterscheidet zwischen der parallelen und der sequenziellen Färbemethode. Bei erstgenannter werden jeweils alle primären und sekundären Antikörper gemischt und gleichzeitig aufgetragen. Der Vorteil dieser Methode ist, dass sie die gleiche Zeit benötigt wie eine Einfachfärbung. Wenn die Antikörper gleichzeitig aufgetragen werden, kann es allerdings zu einer gegenseitigen Beeinflussung kommen.

Bei der sequentiellen Färbung werden mehrere Einfachfärbungen hintereinander ausgeführt. Dabei werden nacheinander der erste Primärantikörper, dann der entsprechende Sekundärantikörper, dann der zweite Primärantikörper, sowie der entsprechende Sekundärantikörper, usw. Bei dieser Art der Färbung besteht keine Gefahr der gegenseitigen Beeinflussung der Antikörper. Der Nachteil ist aber, dass die für die Färbung benötigte Zeit mit der Anzahl der Antikörper zunimmt, da für jedes Antikörper-Paar die verschiedenen Wasch- und Inkubationsschritte separat durchgeführt werden müssen.

4.9.2 Vorbereitung

Herstellung einer sterilen Phosphat gepufferten Salzlösung (PBS)

Geräte

- Autoklav (Fedegari)
- Magnetrührer (Framo®-Gerätetechnik)
- Osmometer (Gonotec)
- pH-Meter (Metrohm)

Materialien und Reagentien

- Aqua bidest.
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- NaCl (Merck)
- NaOH (Merck)
- HCl (Merck)
- KCl (Merck)
- KH_2PO_4 (Merck)

Durchführung

0,2 g KCl, 8,01 g NaCl, 0,21 g KH_2PO_4 und 1,44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ werden in 800 ml aqua bidest. gelöst. Anschließend muss der pH-Wert mit NaOH oder HCl auf 7,40 eingestellt werden. Danach wird mit aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt. Die Osmolarität wird mithilfe eines Osmometers gemessen und sollte 0,280-0,305 osmol / kg betragen.

Nach dem Autoklavieren kann die fertige Lösung bei 4 °C gelagert werden.

Herstellung von 50mM NH_4Cl in PBS

Materialien und Reagentien

- NH_4Cl
- PBS (siehe oben)

Durchführung

2,67 g NH_4Cl werden in 1000 ml PBS gelöst. Die fertige Lösung kann bei Raumtemperatur gelagert werden.

4.9.3 Färbung

Geräte

- Schüttler (GFL Gesellschaft für Labortechnik)
- Vortexer (Labinco)

Materialien und Reagentien

- 0.5 % (v/v) Triton X 100 (Merck) + 1 % Bovines Serum Albumin (BSA) in PBS
- 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS
- 50 mM mM NH₄Cl in PBS (Merck)
- Aqua bidest.
- Antikörper (siehe unten)
- 4',6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI; Roche) 1:10000 in aqua bidest.
- Fluoromount G (Southern Biotech)
- Objektträger (Thermo Scientific)
- PBS

Antikörper

In früheren Arbeiten wurde ein Modell entwickelt, um OC mithilfe der Immunfluoreszenz zu detektieren. Dabei werden folgende Antikörper verwendet (siehe auch Tabelle 9): Zur Färbung aller Zellen wird ein Antikörper gegen den membranständigen Calcitonin-Rezeptor, sowie ein Antikörper gegen α -Tubulin, welcher zur Färbung des Cytoskeletts dient, verwendet. OC werden mit einem Antikörper gegen F4 / 80 Makrophagen-Marker von ihren Vorläuferzellen unterschieden, da dieses Antigen nur auf besagten Vorläuferzellen zu finden ist. Der Melatonin-Rezeptor MT₁ wird ebenfalls durch einen spezifischen Antikörper detektiert. Zur Färbung der Zellkerne wird DAPI eingesetzt.

Alle Antikörper werden in 0,5 % Triton X 100 + 1 % BSA in PBS verdünnt.

Tabelle 9: Liste der verwendeten primären und sekundären Antikörper

	Antikörper	Verdünnung	Zweck
Primäre Antikörper	Goat anti MT1 (Santa Cruz)	1:100	Quantifizierung des MT1-Rezeptors
	Rat anti F4 / 80 macrophage marker (eBioscience.com)	1:1000	Färbung von OC-Vorläuferzellen
	Rabbit anti calcitonin receptor (Acris)	1:1000	Färbung der Plasmamembran aller Zellen
	Mouse anti α -Tubulin (SigmaAldrich)	1:1000	Färbung des Cytoskeletts aller Zellen
Sekundäre Antikörper	Donkey anti goat IgG Alexa Fluor 647 (Invitrogen molecular probes)	1:1000	
	Goat anti rat IgG Alexa Fluor 568 (Invitrogen molecular probes)	1:1000	
	Goat anti mouse IgG Alexa Fluor 647 (Invitrogen molecular probes) Goat anti mouse IgG Alexa Fluor 750 (Invitrogen molecular probes)	1:1000	
	Goat anti rabbit IgG Alexa Fluor 647 (Invitrogen molecular probes) Goat anti rabbit IgG Alexa Fluor 750 (Invitrogen molecular probes)	1:1000	

Durchführung

1. Fixierung der Zellen

Zuerst muss das Nährmedium, welches sich in den Wells befindet, abgesaugt werden. Danach erfolgen zwei Waschschrte mit jeweils 5 Minuten. Dazu werden in jedes Well 1 ml PBS pipettiert, die Platte 5 Minuten am Schüttler stehen gelassen und die Lösung wieder abgesaugt. Anschließend werden je 1 ml 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS in die Wells gegeben und 15 Minuten inkubiert. Zum Schluss werden die OC mit einer 50 mM NH_4Cl -Lösung für 10 Minuten gewaschen, um die freien Aldehydgruppen des PFAs abzudecken.

2. Permeabilisation und Blocken

In diesem Schritt wird die Membran der Zellen permeabel gemacht, um die Penetration der Antikörper zu ermöglichen. Dazu wird die Platte für 60 Minuten mit einer 1 %-igen Lösung aus BSA in PBS, welche mit 0,5 % Triton X 100 versetzt ist, inkubiert. Triton X 100 ist ein nichtionisches Tensid, mit dessen Hilfe die Membranproteine aus der Membran gelöst werden.

3. Bindung der primären Antikörper

Die Antikörper werden zunächst in 0,5 % Triton X 100 + 1 % BSA in PBS verdünnt (siehe Tabelle 9). Danach werden die Deckgläser mit der Antikörper-Lösung bedeckt und die Platte eine Stunde inkubiert. Anschließend folgen 4 Waschschrirte mit PBS für jeweils 10 Minuten.

4. Bindung der sekundären Antikörper

Da die sekundären Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen sind, muss ab diesem Zeitpunkt im Dunkeln gearbeitet werden. Mit oben genannter Lösung wird eine Verdünnung der Antikörper hergestellt (siehe Tabelle 9). Nach dem Auftragen der Antikörper wird die Platte, welche mit Alufolie abgedeckt wird, 30 Minuten inkubiert. Danach folgen 2 Waschschrirte mit PBS für jeweils 10 Minuten.

5. Färbung der Zellkerne

Die Färbung erfolgt durch das Aufbringen von DAPI. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher mit der DNA interkaliert. Unter UV-Licht erscheinen die Zellkerne in blauer Farbe.

Zunächst muss der Farbstoff mit aqua bidest. 1:10000 verdünnt werden. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten werden die Zellen weitere 2 mal für 5 Minuten mit aqua bidest. gewaschen.

6. Aufbringen der Deckgläser auf den Objektträger

Ein Tropfen Fluoromount G wird auf den Objektträger aufgetragen. Danach werden die Deckgläser, die mithilfe einer Nadel angehoben und mit einer Pinzette aus dem Well genommen werden, mit den Zellen nach unten auf den vorbereiteten Objektträger gelegt und über Nacht trocknen gelassen.

4.9.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde durchgeführt mit ZEISS Axio Imager Z1 Mikroskop, welches mit TissueFAXS (TF; TissueGnostics GmbH) Hard- und Software ausgestattet ist.

Die Deckgläser werden mit Ethanol gereinigt und anschließend in den Objekttisch eingespannt. Danach wird die Mikroskopie laut Betriebsanleitung durchgeführt.

4.10 Tartrat-resistente saure Phosphatase-Färbung

4.10.1 Prinzip

Die Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP)-Färbung ist eine histochemische Methode zur Detektion von OC. TRAP ist ein Enzym, welches von OC exprimiert wird und somit als OC-Marker verwendet werden kann.

Nachdem die OC angefärbt wurden, können sie im Durchlichtmikroskop als violette Zellen mit mehr als drei Kernen identifiziert werden.

4.10.2 Vorbereitung

Herstellung des Citratpuffers

Materialien und Reagentien

- Zitronensäure (Merck)
- NaCl (Merck)
- Na-Citrat (Merck)
- Aqua bidest.

Durchführung

0,4 g Zitronensäure, 0,265 g Natriumcitrat und 0,07 g Natriumchlorid werden in 100 ml destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung kann bei 4 °C aufbewahrt werden.

Herstellung der Fixierlösung

Materialien und Reagentien

- Citratpuffer (siehe oben)
- Formaldehyd (37 %; Merck)
- Aceton (Merck)

Durchführung

25 ml Citratpuffer werden mit 8 ml 37 % Formaldehyd und 65 ml Aceton gründlich gemischt. Die Lösung kann bei 4 °C aufbewahrt werden.

4.10.3 Färbung

Geräte

- Schüttler (GFL Gesellschaft für Labortechnik)

Materialien und Reagentien

- TRAP-Färbekit (Sigma-Aldrich), enthält:
 - o Acetat
 - o Tartat
 - o Naphtol
 - o o-Aminoazotoluen
 - o Nitritlösung
- Aqua bidest
- Fixierlösung (siehe 3.10.2)

Durchführung

Zunächst werden die Färbelösungen a) und b) bereitet. Färbelösung a): 9 ml aqua bidest, 400 µl Acetat, 200 µl Tartrat und 100 µl Naphtol werden gründlich

gemischt. Färbelösung b): 100 µl Nitritlösung und 100 µl o-Aminoazotoluen werden gründlich gemischt.

Als nächstes muss das Zellkultur-Medium von den Zellen abgesaugt werden.

Danach werden 250 µl der zuvor gemischten Fixierlösung zugegeben und die Zellkulturplatte 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen der Fixierlösung wird die Platte zwei Mal mit aqua bidest. gewaschen. Zur Herstellung der Färbelösung werden Lösung a) und b) zusammengemischt und anschließend 250 µl der Lösung aufgetragen. Nun wird die Platte 20 Minuten unter

Lichtausschluss am Schüttler inkubiert. Zum Schluss wird die Lösung entfernt und die Platte nochmals mit aqua bidest. gewaschen. Die gefärbten OC können unter dem Mikroskop betrachtet und gezählt werden.

5. ERGEBNISSE

5.1 Optimierung einer OC-Zellkultur

Um ein optimales OC-Wachstum zu gewährleisten, wurden verschiedene Kulturbedingungen und Medien mit verschiedenen Zusätzen getestet. Da eine detaillierte Beschreibung der durchgeführten Versuche den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde, sind die einzelnen Parameter und die sich daraus ergebenden Resultate in verkürzter Form in nachstehender Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Liste der verwendeten Zusätze und Kultur-Bedingungen

Parameter		Erklärung	Ergebnis
Plattengröße	24-Well Platte 48-Well Platte	Um mehrere Versuche pro Platte zu machen, wurde versucht, die Kultur in kleineren Wells in einer 48-Well Platte anzulegen	Die Zellen wuchsen sowohl auf einer 24-Well als auch auf einer 48-Well Platte, wobei die 24-Well Platte leicht verbesserte Ergebnisse brachte.
Inkubationszeit	5 Tage 7 Tage 8 Tage	Nach 8 Tagen Inkubationszeit trat sehr dichtes Zellwachstum auf, wodurch sich in der Mitte der Wells Netzwerke aus Zellen bildeten. Um dies zu vermeiden, wurde versucht, die Inkubationszeit zu verkürzen.	Das beste Ergebnis wurde bei einer Inkubationszeit von 7 Tagen erreicht.
Zellzahl	48-Well Platte: 0,5x10 ⁶ , 0,75x10 ⁶ Zellen/Well 24-Well Platte: 1x10 ⁶ , 1,5x10 ⁶ , 2x10 ⁶ Zellen / Well	Ein Versuch die Bildung von Netzwerken zwischen den Zellen zu vermeiden, stellte die Reduktion der Zellzahl dar.	Die Verringerung der Zellzahl von 0,75x10 ⁶ Zellen auf 0,5x10 ⁶ Zellen auf der 48-Well Platte machte keinen Unterschied in Zelldichte und Wachstum. Die Verringerung der Zellzahl auf der 24-Well Platte von 2 x 10 ⁶ Zellen auf die Hälfte verringerte allerdings das OC-Wachstum. Das beste Ergebnis wurde bei einer Zellzahl von 1,5 x 10 ⁶ Zellen/Well erreicht.

Tabelle 10: Fortsetzung

Medium	α MEM RPMI α MEM+Hepes	Um das OC-Wachstum zu fördern, wurden verschiedene Medien getestet.	Das beste Zell-/OC-Wachstum war beim α MEM-Medium ohne Hepes zu erkennen.
pH-Wert	Standard 7,2 7,4	Der pH Wert des Mediums wurde während der Kulturphase gemessen, um eine durch das Zellwachstum bedingte Änderung zu erkennen. Weiters wurde der Einfluss von Medien mit unterschiedlichen pH-Werten auf das Zellwachstum untersucht.	Der pH Wert des Mediums änderte sich im Verlauf der Zellkultur nur unwesentlich. Durch die Senkung des pH-Wertes konnte keine Verbesserung des Zell-/OC-Wachstums erreicht werden.

Als optimale Bedingungen für die OC-Zellkultur wurden daher folgende Parameter festgelegt:

- Inkubationszeit von 7 Tagen
- Zellzahl von $1,5 \times 10^6$ Zellen / Well auf einer 24-Well Platte
- α MEM-Medium

5.2 TRAP-Färbung zur Quantifizierung von Osteoklasten

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Melatonin auf das OC-Wachstum untersucht. Dazu wurden verschiedene Melatonin-Konzentrationen, ausgehend von therapeutischen bis hin zu physiologischen (10 μ M-100 nM) Dosen verwendet. Um einen Einfluss des verwendeten Lösungsmittels DMSO auszuschließen, wurden zusätzlich die den jeweiligen Melatonin-Konzentrationen entsprechenden DMSO-Konzentrationen getestet. Zum Vergleich wurden außerdem unbehandelte Kontrollgruppen miteinbezogen.

Die Quantifizierung des Außmases dieses Einflusses sollte in weiterer Folge mit Hilfe eines automatischen Bildanalysesystems, das im Rahmen des FFG-Bridge Projektes zusammen mit den Partnern, den Firmen TissueGnostics GmbH und Seewald Solutions, an der Medizinischen Universität Wien entwickelt wird. Da diese neue Methode eine Verbesserung der etablierten Verfahren bringen soll, wurde zunächst der Einfluss von Melatonin auf das OC-Wachstum über die TRAP-Färbung als klassische Methode zur Erkennung und Quantifizierung von OC

bestimmt. Dabei wurden nach der Färbung (siehe Material und Methoden 4.10) die Zellen, sowohl OC als auch nicht-OC, manuell ausgezählt. Unter Verwendung eines ZeissAxioVision Mikroskops wurde die Zählung mithilfe eines 20x Objektivs durchgeführt. Dabei wurden alle TRAP-positiven Zellen, welche mehr als 3 Zellkerne besaßen, als OC identifiziert. Die Auszählung erfolgte durch zwei Experten, Experte 1 (Experte 1) und der Autorin (Experte 2), welche diese Evaluierung unabhängig voneinander durchführten. Um die Auszählung zu erleichtern, wurden vier mikroskopische Bilder pro Deckglas erstellt und am Computer ausgezählt (Abbildung 8).

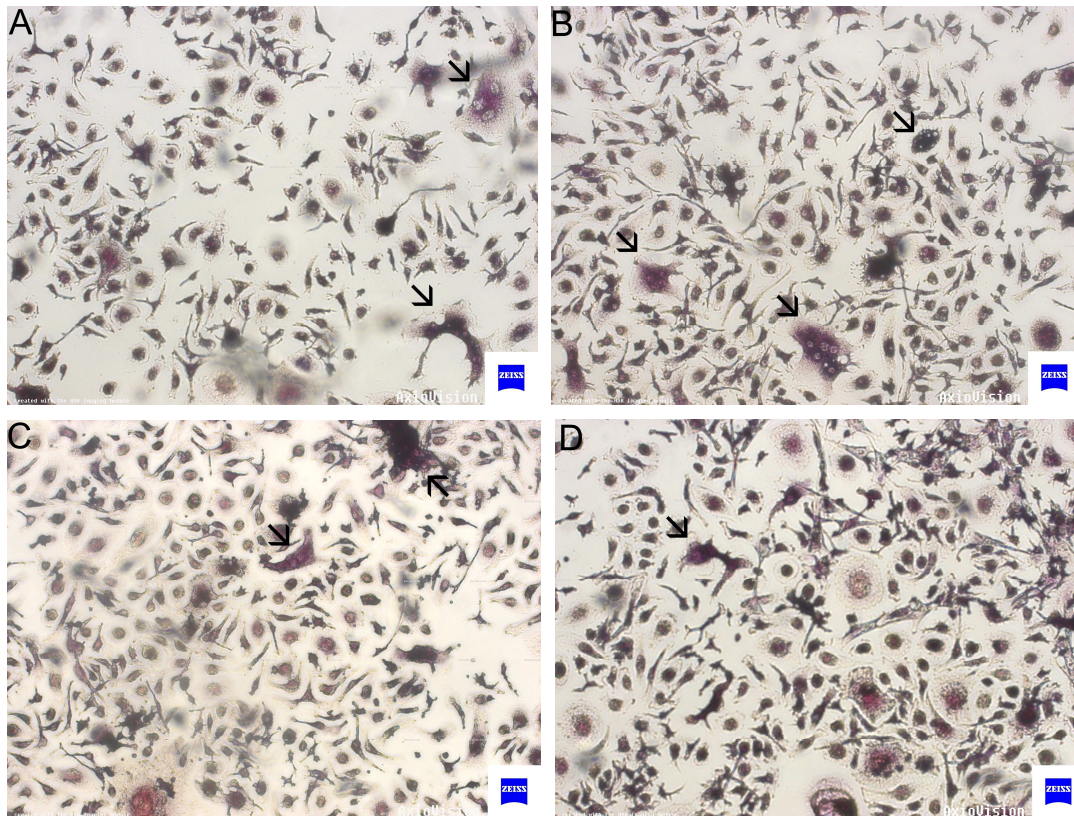


Abbildung 8: Beispielbilder der durch TRAP-Färbung dargestellten Osteoklasten. A, B, C, D: 4 Bilder / Deckglas

Tabelle 11: Ergebnis der OC-Auszählung. MS: Experte 1. KB: Experte 2. Gesamt: Mittelwert KB und MS. m: Mittelwert. Sd m: Standardabweichung vom Mittelwert. A,B,C,D: 4 FOVs pro Deckglas.

		MS			KB			Gesamt		
		OC	m OC	Sd m OC	OC	m OC	Sd m OC	OC	mOC	Sd m OC
Mel 10 µM	A	0	0	0,5	0	0,5	1,0	0,0	0,5	0,6
	B	0			0			0,0		
	C	1			1			1,0		
	D	0			2			1,0		
Mel 1 µM	A	3	3	0,0	2	2	0,8	2,5	2,5	0,4
	B	3			2			2,5		
	C	3			3			3,0		
	D	3			1			2,0		
Mel 100 nM	A	1	2	0,8	1	2,5	1,0	1,0	2,25	0,9
	B	3			3			3,0		
	C	2			3			2,5		
	D	2			2			2,0		
Mel 10 nM	A	6	6	3,2	4	3	2,1	5,0	5	2,6
	B									
	C	1			0			0,5		
	D	7			3			5,0		
Mel 1 nM	A	4	3,5	0,6	4	2	1,0	4,0	2,75	0,7
	B	3			2			2,5		
	C	3			2			2,5		
	D	4			2			3,0		
Mel 100 pM	A	6	3,5	2,1	6	3	1,9	6,0	3,25	2,0
	B	2			2			2,0		
	C	5			4			4,5		
	D	2			2			2,0		
DMSO 1	A	/								
	B	/								
	C	/								
	D	/								
DMSO 10	A	10	6	2,2	3	3	1,3	6,5	4,5	1,3
	B	6			4			5,0		
	C	5			3			4,0		
	D	6			1			3,5		
DMSO 100	A	0	0		0	0		0,0	0	
	B	/								
	C	/								
	D	/								
DMSO 1k	A	0			0	0		0,0	0	
	B	/								
	C	/								
	D	/								
DMSO 10k	A	3	5	2,0	1	2	1,5	2,0	4,5	1,4
	B	/								
	C	7			2			4,5		
	D	5			4			4,5		
DMSO 100k	A	4	2,5	1,0	1	1	0,5	2,5	2	0,4
	B	2			2			2,0		
	C	2			1			1,5		
	D	3			1			2,0		
Pos	A	4	3,5	1,4	4	3	0,6	4,0	3,5	0,5
	B	4			3			3,5		
	C	3			3			3,0		
	D	1			1			1,0		

Tabelle 12: Ergebnis der nicht-OC-Auszählung. MS: Experte 1. KB: Experte 2. m: Mittelwert. Sd m: Standardabweichung vom Mittelwert. A,B,C,D: 4 FOVs pro Deckglas.

		MS			KB			Gesamt		
		nOC	m nOC	Sd m nOC	nOC	m nOC	Sd m nOC	nOC	m nOC	Sd m nOC
Mel 10 µM	A	43	163	211,7	13,0	153	187,7	28,0	152,75	199,4
	B	22			50			36,0		
	C	467			415			441,0		
	D	283			256			269,5		
Mel 1 µM	A	216	197,5	74,4	235,0	227	78,3	225,5	212,25	76,0
	B	179			219			199,0		
	C	302			317			309,5		
	D	125			126			125,5		
Mel 100 nM	A	238	228	56,8	229,0	225	67,1	233,5	226,5	61,8
	B	218			221			219,5		
	C	286			304			295,0		
	D	149			140			144,5		
Mel 10 nM	A	199	245	109,8	179,0	179	76,0	189,0	208,5	92,2
	B									
	C	408			307			357,5		
	D	245			172			208,5		
Mel 1 nM	A	205	199,5	83,7	180,0	164,5	67,5	192,5	176,25	74,5
	B	171			149			160,0		
	C	194			121			157,5		
	D	355			276			315,5		
Mel 100 pM	A	156	183,5	26,4	151,0	179,5	20,0	153,5	181,5	23,0
	B	180			176			178,0		
	C	187			183			185,0		
	D	220			199			209,5		
DMSO 1	A	/								
	B	/								
	C	/								
	D	/								
DMSO 10	A	185	287	91,7	165,0	255	77,2	175,0	271	83,8
	B	328			307			317,5		
	C	246			203			224,5		
	D	394			322			358,0		
DMSO 100	A	16	16					16,0	16	
	B									
	C									
	D									
DMSO 1k	A	84	84					84,0	84	
	B									
	C									
	D									
DMSO 10k	A	344	325	49,1	333,0	290	70,1	338,5	307,5	59,5
	B									
	C	251			196			223,5		
	D	325			290			307,5		
DMSO 100k	A	292	251	64,8	294,0	253,5	101,7	293,0	252,25	82,4
	B	319			329			324,0		
	C	183			100			141,5		
	D	210			213			211,5		
Pos	A	188	255,5	39,6	220,0	239,5	14,0	204,0	247,75	26,4
	B	264			249			256,5		
	C	278			248			263,0		
	D	247			231			239,0		

Tabelle 13: Verhältnis von OC zu nichtOC. MS: Experte 1. KB: Experte 2. Gesamt: Mittelwert KB und MS. m: Mittelwert. Sd m: Standardabweichung vom Mittelwert. A,B,C,D: 4 FOVs pro Deckglas.

		MS			KB			Gesamt		
		% OC	m % OC m	Sd % OC	% OC	m % OC m	Sd % OC	% OC	m % OC m	Sd % OC
Mel 10 µM	A	0,0	0,1	0,107	0,0	0,26	0,37	0,00	0,15	0,18
	B	0,0			0,0			0,00		
	C	0,2			0,2			0,23		
	D	0,0			0,8			0,37		
Mel 1 µM	A	1,4	1,6	0,594	0,9	0,88	0,07	1,11	1,23	0,27
	B	1,7			0,9			1,26		
	C	1,0			0,9			0,97		
	D	2,4			0,8			1,59		
Mel 100 nM	A	0,4	1,0	0,476	0,4	1,05	0,45	0,43	1,01	0,46
	B	1,4			1,4			1,37		
	C	0,7			1,0			0,85		
	D	1,3			1,4			1,38		
Mel 10 nM	A	3,0	2,0	1,556	2,2	1,33	1,17	2,65	1,73	1,38
	B									
	C	0,2			0,0			0,14		
	D	2,9			1,7			2,40		
Mel 1 nM	A	2,0	1,6	0,353	2,2	1,49	0,62	2,08	1,54	0,46
	B	1,8			1,3			1,56		
	C	1,5			1,7			1,59		
	D	1,1			0,7			0,95		
Mel 100 pM	A	3,8	2,1	1,387	4,0	2,08	1,37	3,91	2,10	1,37
	B	1,1			1,1			1,12		
	C	2,7			2,2			2,43		
	D	0,9			1,0			0,95		
DMSO 1	A									
	B									
	C									
	D									
DMSO 10	A	5,4	2,7	1,817	1,8	1,23	0,65	3,71	2,01	1,18
	B	1,8			1,3			1,57		
	C	2,0			1,5			1,78		
	D	1,5			0,3			0,98		
DMSO 100	A	0,0	0,0					0,00	0,00	
	B									
	C									
	D									
DMSO 1k	A							0,00	0,00	
	B									
	C									
	D									
DMSO 10k	A	0,9	1,7	0,973	0,3	0,90	0,55	0,59	1,36	0,72
	B									
	C	2,8			1,0			2,01		
	D	1,5			1,4			1,46		
DMSO 100k	A	1,4	1,1	0,366	0,3	0,60	0,29	0,85	0,87	0,19
	B	0,6			0,6			0,62		
	C	1,1			1,0			1,06		
	D	1,4			0,5			0,95		
Pos	A	2,1	1,3	0,726	1,8	1,17	0,57	1,96	1,22	0,64
	B	1,5			1,2			1,36		
	C	1,1			1,2			1,14		
	D	0,4			0,4			0,42		

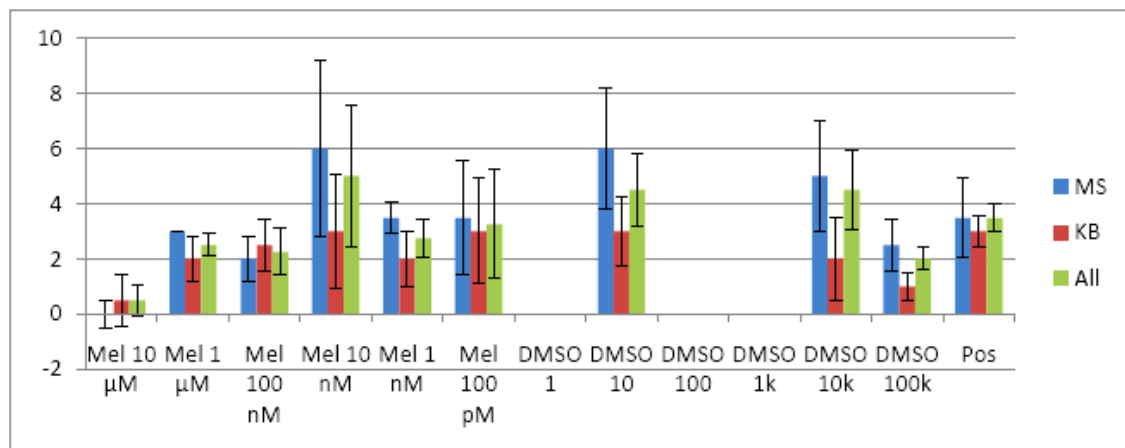


Abbildung 9: Zahl der OC. MS: Experte 1. KB: Experte 2. All: Gesamt. Mel: Melatonin. Pos: Positivkontrolle

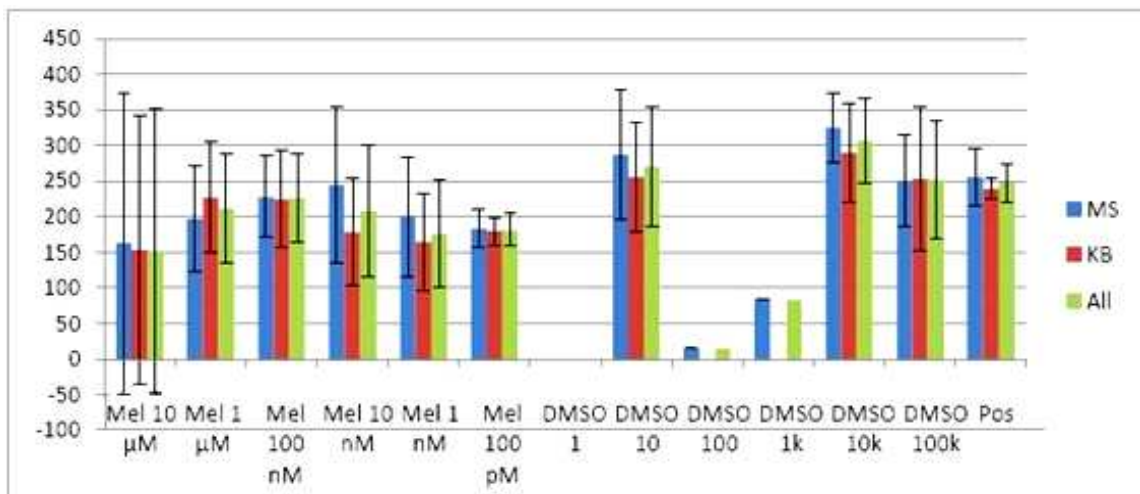


Abbildung 10: Zahl der nicht-Osteoklasten. MS: Experte 1. KB: Experte 2. All: Gesamt. Mel: Melatonin. Pos: Positivkontrolle

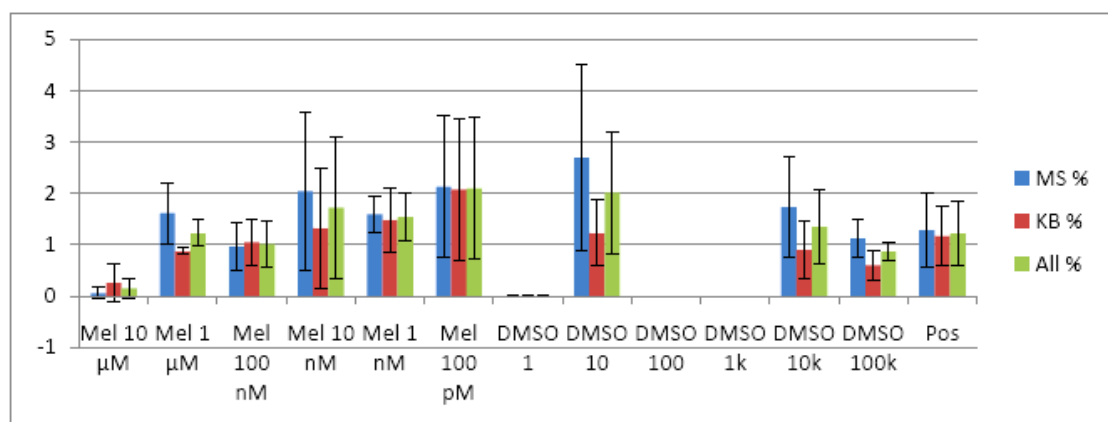


Abbildung 11: Verhältnis OC zu nicht-OC. MS: Experte 1. KB: Experte 2. All: Gesamt. Mel: Melatonin. Pos: Positivkontrolle

Die Ergebnisse variierten stark, nicht nur zwischen den einzelnen Wells, sondern auch zwischen den Experten (siehe Abbildungen 9, 10, 11, Tabellen 11, 12, 13). Aufgrund dessen ist die Standardabweichung sehr hoch. Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den verschiedenen Melatonin-Konzentrationen und dem OC-Wachstum erkannt werden, jedoch zeichnete sich ein Trend in Richtung verringerten OC-Wachstums bei höheren Melatonin-Konzentrationen (1 μ M, 10 μ M) ab. Die Ergebnisse müssen kritisch betrachtet werden, da teilweise gar kein Zellwachstum zu verzeichnen war (DMSO 1, DMSO 100 und DMSO 1k). Dieses fehlende Zellwachstum könnte die verminderte Anzahl an Osteoklasten in diesen Kulturen erklären.

5.3 Immunfluoreszenzfärbungen zur OC erkennung

a) Detektion von OC und deren Vorläuferzellen mithilfe einer automatischen Quantifizierungs-Software

Da die Quantifizierung von OC sowie deren Vorläuferzellen mittels TRAP-Färbung schwierig und schlecht reproduzierbar war, wird, wie bereits oben erwähnt, im Rahmen eines interdisziplinären Projektes zwischen TissueGnostics GmbH, Seewald Solutions, sowie der Medizinische Universität Wien versucht, eine Software zur automatischen Erkennung und Quantifizierung von OC in einer Zellkultur zu entwickeln. Die genaue Beschreibung dieser Software ist nicht Teil dieser Arbeit und kann unter [52] nachgelesen werden.

Um diese automatische Auswertung zu ermöglichen, mussten die Zellen zunächst mithilfe von Immunfluoreszenz-Färbung sichtbar gemacht werden. Zur Färbung aller Zellen wurde ein Antikörper gegen den Calcitonin-Rezeptor sowie ein Antikörper gegen α -Tubulin zur Färbung des Cytoskeletts, verwendet. Osteoklasten wurden mit einem Antikörper gegen F4 / 80 Makrophagen-Marker detektiert. Zur Färbung der Zellkerne wurde DAPI eingesetzt.

Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmikroskopie mit einem ZEISS Axio Imager Z1 Mikroskop ausgerüstet mit TissueFAXS Hard- und Software (TissueGnostics GmbH) unter Verwendung eines 20x bzw. 40x Objektivs.

Nach der Aufnahme wurden die fertigen Bilder mithilfe der neu entwickelten Analysen-Software automatisch analysiert (Abbildung 12). Der Vorteil dieser Software besteht darin, dass eine Vielzahl an Parametern bestimmt werden kann. Dazu zählen die Zahl an OC sowie nicht-OC, deren Fläche, die Anzahl der Zellkerne sowie das Verhältnis zwischen OC und nicht-OC.

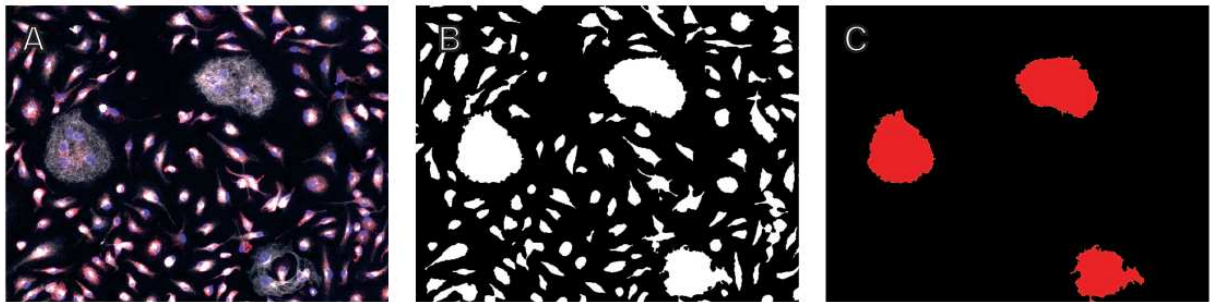


Abbildung 12: Automatische Bildanalyse von OC. A: Immunfluoreszenzbild von OC und Vorläuferzellen. B: Detektion aller Zellen durch die Software. C: Maske zur Erkennung von OCs

Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass die Analyse nicht auf kleine Bereiche beschränkt bleibt (wie in obiger Abbildung), sondern auch auf sehr große Regionen angewendet werden kann (Abbildung 13).

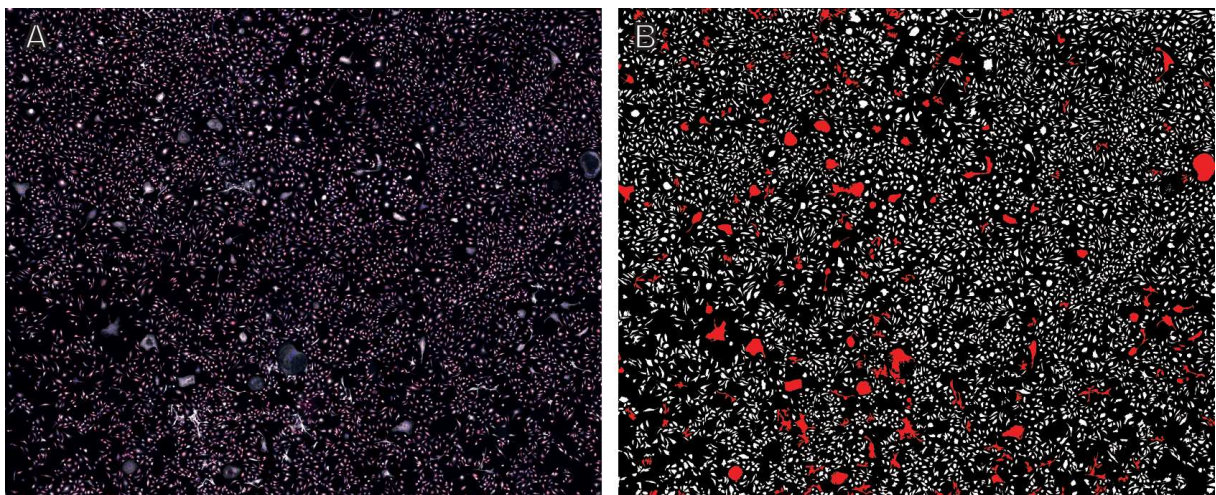


Abbildung 13: Bild-Analyse einer gesamten Region. A: Bild der Immunfluoreszenzfärbung. B: Ergebnis der Bildanalyse, OC in rot, nicht-OC in weiß

Entsprechend 4.2 wurde nun eine Kultur mit verschiedenen Konzentrationen von Melatonin, den entsprechenden DMSO-Konzentrationen sowie Kontrollgruppen angelegt.

Mithilfe der Analyse-Software wurden folgende Parameter untersucht: das Verhältnis der Anzahl an OC zu nicht-OC (Tabelle 14), sowie das Verhältnis der Fläche von OC zu nicht-OC (Tabelle 15).

Tabelle 14: Ergebnis der automatischen Analyse der Anzahl an OC und nicht-OC. Gesamte Zellzahl, Anzahl an OC, sowie nicht-OC, prozentueller Anteil der OC-Anzahl.

Probe	Zellzahl	Anzahl an OC	Anzahl an nicht-OC	% OC-Anzahl
Kontrolle	5878	70	5808	1,19
Mel 1 μ M	7029	177	6852	2,52
Mel 100 nM	8066	101	7965	1,25
Mel 10 nM	6536	45	6491	0,69

Tabelle 15: Ergebnis der automatischen Analyse der Fläche an OC und nicht-OC. Gesamte Zellfläche, Fläche von OC sowie nicht-OC, prozentueller Anteil der OC-Fläche.

Probe	Zellfläche	Fläche OC	Fläche nicht-OC	% OC-Fläche
Kontrolle	6593279	832434	5760845	12,63
Mel 1 μ M	14423551	1425146	12998405	9,88
Mel 100 nM	14515362	1146583	13368779	7,90
Mel 10 nM	8348446	369692	7978754	4,43

Die Auswertung der Zellzahl ergab eine signifikante Reduktion der OC-Anzahl bei physiologischen Konzentrationen (10–100 nM) an Melatonin, verglichen mit pharmakologischen (1 μ M). Im Vergleich zur Kontrollgruppe stieg die Anzahl an OC bei einer Melatonin-Konzentration von 1 μ M und sank bei einer Konzentration von 10 nM. Bei einer Konzentration von 100 nM war die OC-Anzahl ähnlich der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 14A).

Die Beurteilung der Zell-Fläche ergab ebenfalls ein reduziertes OC-Wachstum bei physiologischen Melatonin-Konzentrationen. Im Gegensatz zur Anzahl der Zellen, war die Zell-Fläche der OC in der Kontrollgruppe höher, als jene, welche mit Melatonin behandelt wurden (siehe Abbildung 14B).

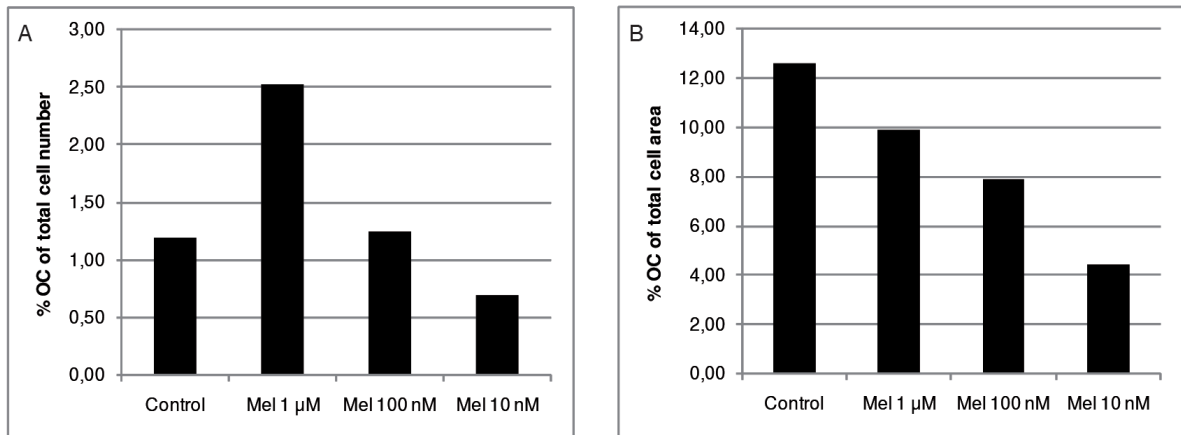


Abbildung 14: OC-Wachstum unter dem Einfluss von Melatonin. A: Verhältnis der OC-Anzahl zur gesamten Zellzahl. B: Verhältnis der OC-Fläche zur Fläche der gesamten Zellen.

Weiters wurde unter dem Einfluss höherer Melatonin-Konzentrationen eine Bildung von Netzwerken aus Zellen beobachtet, wodurch die Auswertung unmöglich wurde. Bei der entsprechenden DMSO-Konzentration konnte dieses Phänomen nicht aufgezeigt werden (Abbildung 15).

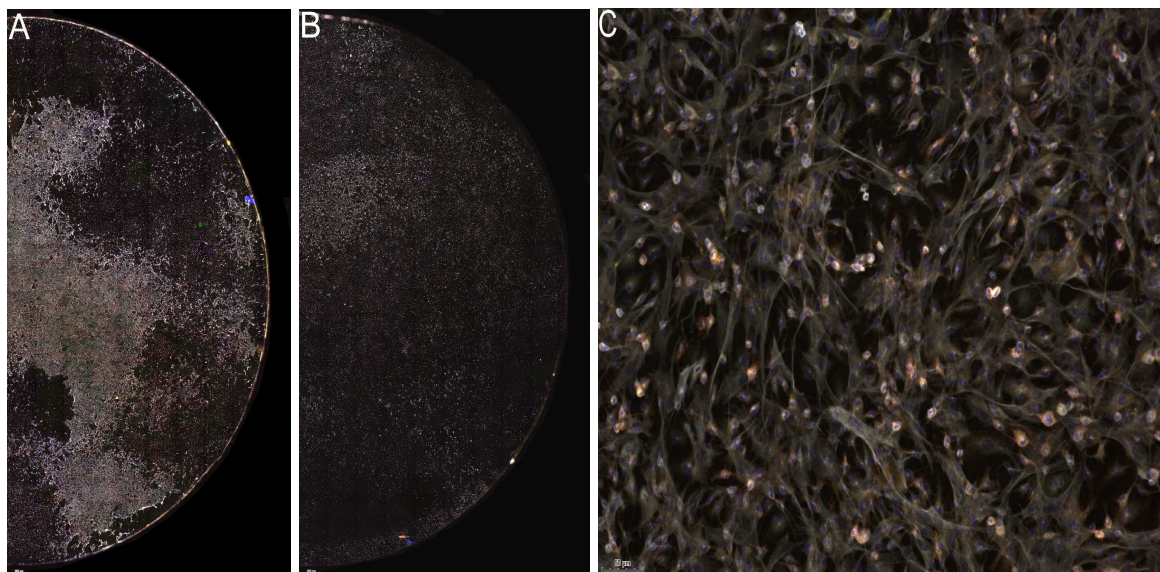


Abbildung 15: Netzwerkbildung unter höheren Melatonin-Konzentrationen. A: Melatonin 1 µM. B: DMSO. C: Melatonin 1 µM

b) Qualitative Analyse der Melatonin-Rezeptors MT₁

Im Rahmen der Immunfluoreszenzfärbung wurde in einem Vorversuch das Vorkommen und die Lokalisation des Melatonin-Rezeptors MT₁ in OCs und deren Vorläuferzellen untersucht.

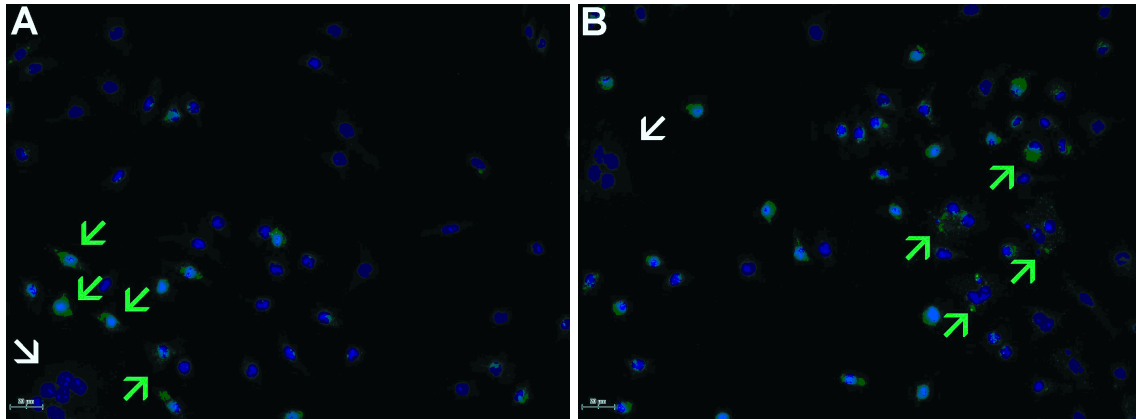


Abbildung 16: Qualitative Analyse des MT₁-Rezeptors. A: DMSO. B: Melatonin. Weiße Pfeile: OC. Grüne Pfeile: OC-Vorläuferzellen

Nach Auswertung der Ergebnisse zeigte sich, dass MT₁ augenscheinlich in Vorläuferzellen höher exprimiert ist als in den OCs (Abbildung 16). Da die Immunfluoreszenzfärbung durch den Antikörper gegen MT₁ sehr schwach ist, wurde keine Quantifizierung mithilfe der Analysen-Software durchgeführt.

5.4 Nachweis des MT₁ Rezeptors mittels RT-PCR

Mittels Immunfluoreszenzfärbung konnte eine Expression von MT₁ in den OCs und den Vorläuferzellen nachgewiesen werden. Um die Expression auch auf RNA Ebene zu bestätigen, wurde eine qRT-PCR durchgeführt.

Die Isolierung der RNA wurde, wie in Kapitel 4.3 beschrieben, durchgeführt.

Mittels UV / VIS Spektrophotometrie wurden Menge und Reinheit der isolierten RNA bestimmt. Der A260 / 280 Quotient von 1.74 bis 1.77 zeigte eine akzeptable Reinheit der isolierten RNA (Tabelle 16). Durch Gelelektrophorese konnten 2 Banden für 18S nachgewiesen werden, was zeigt, dass die isolierte RNA intakt war, und für die PCR nach reverser Transkription, wie in Kapitel 4.6 beschrieben, verwendet werden konnte.

Tabelle 16: Konzentration und A 260 / 280 der verschiedenen Proben. C: Konzentration

	C [ng/ μ l]	A 260 / 280
Mel 1 μM	594.4	1.77
Mel 10 nM	183.8	1.77
Mel 100 pM	388.0	1.74
pos	387.1	1.73

Um zu überprüfen, ob die reverse Transkription erfolgreich war und um die Expression des MT₁ zu normalisieren, wurde zunächst eine PCR für das House-Keeping Gene β -Actin in allen Proben durchgeführt. Zur Überprüfung der PCR wurden sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle miteinbezogen.

Da aufgrund vorangegangener Vorversuche (Schepelmann und Ellinger, Manuskript in Präparation) und der Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen nur eine sehr geringe Expression von MT₁ zu erwarten war, wurde eine qPCR mittels einer TaqMan Sonde durchgeführt.

Es wurde die Expression von beiden Melatonin-Rezeptoren MT₁ und MT₂ analysiert. Da β -Actin von allen Zellen in hoher Konzentration exprimiert wird, wurde dieses als Referenzgen verwendet. Weiters wurden Negativkontrollen, welche keine cDNA enthielten, sowie RNA-Proben, welche nicht revers transkribiert wurden, als Kontrollen verwendet.

Es konnte eine Expression von MT₁ mRNA nachgewiesen werden (Tabelle 17). Die sehr hohen Δ CT-Werte lassen jedoch nur auf eine sehr geringe Expression von MT₁ in den kultivierten Knochenmarkszellen schließen. Abbildung 17 zeigt die Δ CT-Werte von 100p, 10n, 1 micro, Pos und der negativ Probe. Außerdem zeigt die Abbildung eine Tendenz zu einer geringeren Expression von MT₁ in den Melatonin-behandelten Gruppen.

Es muss erwähnt werden, dass die CT-Werte für MT₁ nahe am CT-Grenzwert 40 waren, was zeigt, dass die Expression von MT₁ fast an der Nachweisgrenze liegt. Nach Berechnung der DeltaCt Werte zeigte es sich, dass der Einfluß des Hormons zu einer Verminderung der Expression führt.

Tabelle 17: β -Aktin und MT₁ mRNA Expression. CT m: Mittelwert aus drei Wiederholungen. CT SD: Standardabweichung vom CT-Wert. Δ CT m: Mittelwert der Δ CT-Werte mit β -Actin als Referenz. Δ CT SD m: Standardabweichung vom Δ CT m. Undetermined: keine Amplifikation.

Probe	Target	CT m	CT SD	Δ CT m	Δ CT SD m
100p	ACTB FAM	18,18	0,15	20,74	0,76
10n	ACTB FAM	18,73	0,02	18,93	1,13
1micro	ACTB FAM	18,33	0,01	19,55	0,23
Pos	ACTB FAM	19,70	0,05	20,16	0,05
neg	ACTB FAM	38,41	0,50	0,77	1,12
-RT	MT1				
100p	MT1	38,93	0,61		
10n	MT1	37,67	1,11		
1micro	MT1	37,88	0,21		

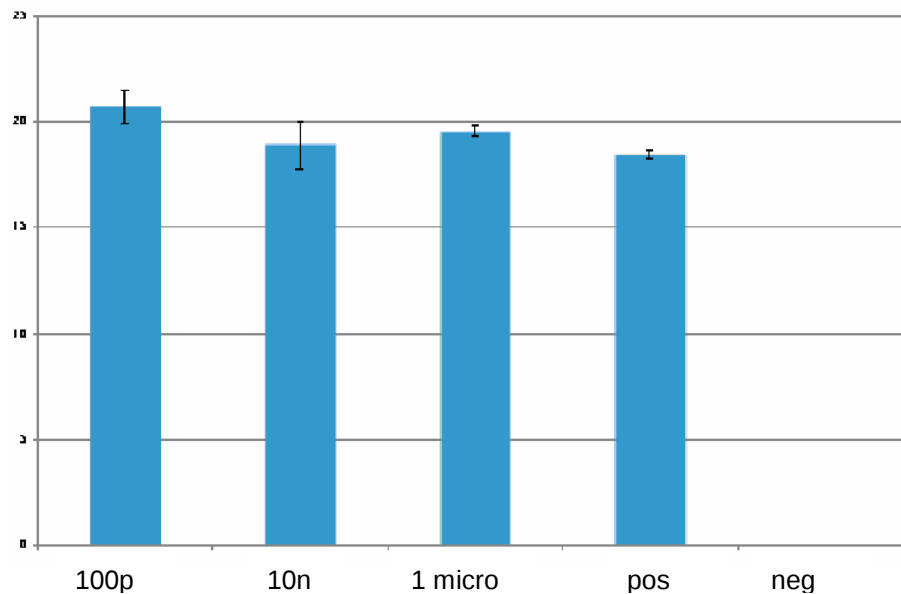


Abbildung 17: Δ CT-Werte von MT₁. Das Diagramm zeigt die Δ CT-Werte von 100p: 10pm, 10n: 1nm, 1 micro: 1 μ m, Pos: Positivkontrolle und neg: Negativkontrolle.

Im Gegensatz zu MT₁ zeigte die qPCR für MT₂ keine detektierbare Expression von MT₂ (Tabelle 18).

Tabelle 18: β -Aktin und MT₂ mRNA Expression. CT: CT-Wert. Undetermined: Keine Amplifikation.

Probe	Target	CT
100p	ACTB FAM	17,73
10n	ACTB FAM	18,39
1micro	ACTB FAM	17,94
Pos	ACTB FAM	19,56
neg	ACTB FAM	36,61
100p	MT2	Undetermined
10n	MT2	Undetermined
1micro	MT2	Undetermined
Pos	MT2	Undetermined
neg	MT2	Undetermined

6. DISKUSSION

Mehrere Studien belegen einen direkten Einfluss von Melatonin auf die Knochenzellen, wobei Untersuchungen einen positiven Effekt von Melatonin auf den Knochen durch Hemmung der Knochenresorption zeigten. Durch die Behandlung von Mäusen mit Melatonin kam es zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl und der Aktivität von OC in vivo. Vermutet wird, dass eine Melatonin-vermittelte Hemmung der durch RANKL-induzierten OC-Bildung erfolgt. Dies geht mit einem Anstieg der OPG-Produktion einher [47-49].

Melatonin könnte den Knochen auch durch seine antioxidative Wirkung beeinflussen. Dieser Mechanismus ist unabhängig von dem durch den Melatoninrezeptor-vermittelten Signaltransduktionsweg. Freie Radikale, die zu einer Stimulierung der den Knochen abbauenden Osteoklasten führen, können durch die antioxidative Wirkung von Melatonin aufgefangen werden. Zusätzlich zu dieser Wirkung als Radikalfänger stimuliert Melatonin auch die Expression zahlreicher antioxidativer Enzyme [39-40].

Daher ist Melatonin in der Lage, in den Knochenstoffwechsel entweder über den Rezeptor oder durch die antioxidative Wirkung einzugreifen.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Melatonin auf die OC Bildung untersucht. Voraussetzung für die Detektion der OC mithilfe der automatischen Analysen-Software war ein optimales OC-Wachstum. Ziel war die Bildung vielkerniger OC in nicht zu dichter Zellzahl zu. Hierfür wurden verschiedene Kultur-Bedingungen und Zusätze zur Kultivierung von OCs aus hämatopoetischen Stammzellen ausgetestet. Die besten Ergebnisse konnten mit einer Zellzahl von $1,5 \times 10^6$ Zellen / Well auf einer 24 Well Platte erzielt werden. Weiters war das Wachstum nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen in α MEM-Medium am besten.

Die TRAP-Färbung stellt die klassische Methode zur Detektion und Auszählung von OC dar, und es existieren zahlreiche Studien, welche sich dieser Methode zur Einschätzung des Einflusses von Substanzen auf das OC-Wachstum bedienen. Die gängige Praxis besteht allerdings darin, lediglich die Anzahl der OC pro Deckglas durch manuelles Zählen zu bestimmen [18][46]. Dahingegen ist es schwer möglich, sämtliche Vorläuferzellen, auf den Deckgläsern bzw. in den Wells

manuell zu detektieren. Um eine Vergleichsbasis mit der angewendeten automatischen Detektionssoftware zu haben, wurde deshalb zunächst das TRAP-Zählverfahren angewandt. Dabei wurden pro Deckglas vier definierte Regionen (mikroskopische Bilder) manuell ausgezählt. Wie die Ergebnisse dieser Auszählung zeigten, variierten diese nicht nur zwischen den einzelnen Bereichen eines Deckglases, sondern auch zwischen den Experten sehr stark. Aufgrund mangelnder Orientierung auf dem Deckglas war es mit dieser Methode auch nur schwer möglich, die Anzahl an Vorläuferzellen zu eruieren. Somit konnte kein sinnvoller Vergleich zur Bestimmung des Verhältnisses Anzahl von OC zu OC-Vorläuferzellen durchgeführt werden.

Ein weiteres Problem stellte die Quantifizierung von OC dar. Als OC wurden alle TRAP positiven Zellen mit mehr als 3 Zellkernen gewertet. Allerdings waren auch OC-Vorläuferzellen mit 1-2 Kernen TRAP-positiv, was die Auszählung erschwerte. Aufgrund dieser Probleme war die Standardabweichung sehr hoch, was wahrscheinlich mit ein Grund dafür sein dürfte, dass mit dieser Versuchsanordnung kein signifikanter Zusammenhang zwischen den verschiedenen Melatonin-Konzentrationen und dem OC-Wachstum erkannt werden konnte.

Aus diesem Grund kann die TRAP-Färbung unter den von uns getesteten Bedingungen nicht zur Quantifizierung von OCs und OC-Vorläuferzellen in einer Zellkultur als geeignet angesehen werden, was die Bedeutung der entwickelten automatischen OC-Quantifizierungs-Software auf Basis Immunfluoreszenz-gefärbter Zellen unterstreicht.

Im nächsten Schritt wurde die Auszählung mithilfe einer automatischen Analyse-Software durchgeführt (siehe 4.9). Dabei wurden nicht nur die Anzahl der Zellen, sondern auch deren Fläche beurteilt, sowie das Verhältnis von OC zu OC-Vorläuferzellen. Die Ergebnisse zeigten bei physiologischen Konzentrationen eine signifikante Reduktion der Zellzahl im Vergleich zu pharmakologischen Konzentrationen. Dies traf auch auf die Fläche der OC zu. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe stieg die Anzahl an OC bei einer Konzentration von 1 μM Melatonin an. Da bei dieser Konzentration vor allem die antioxidativen Wirkungen von Melatonin zu tragen kommen, die aber das Osteoklastenwachstum hemmen sollten, ist die stimulierende Wirkung von Melatonin bei diesen Erkrankungen

nicht bekannt. Betrachtet man die Zellfläche, so war diese in den Melatonin-Gruppen niedriger als in den Kontrollen. Dies bedeutet, dass in der Kontrollgruppe zwar weniger Zellen wuchsen, diese allerdings eine größere Fläche aufwiesen, als jene, welche mit Melatonin behandelt wurden. Dies zeigt, dass nicht nur die OC Zahl als Parameter, wie dies bei der TRAP-Färbung getan wird, sondern auch die Grösse und Zahl der Vorläuferzellen ein wichtiger Faktor für die Untersuchung der OC Bildung ist.

Wie Koyama et al. 2002 [47], ergab auch diese Untersuchung, dass bei physiologischen Melatonin-Konzentrationen die Anzahl an OC sank.

Ein weiterer Hinweis auf den Einfluss von Melatonin auf das Zellwachstum, war die Beobachtung von Zellaggregaten. Diese so genannten Netzwerke bildeten sich unter dem Einfluss höherer Melatonin-Konzentrationen, wodurch keine einzelnen Zellen mehr zu erkennen waren und so die Auszählung mithilfe der Analysen-Software unmöglich wurde. Dieses Phänomen nicht bei den entsprechenden Kontrollen nicht beobachtet werden.

Zum Nachweis des Melatonin-Rezeptors MT_1 wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen diesen Rezeptor angefärbt. Bei diesem Vorversuch schien es, dass die Expression von MT_1 in Vorläuferzellen höher war, als in OC. Eine genaue Quantifizierung mithilfe der Analysen-Software wurde nicht durchgeführt, da die immunreaktive Fluoreszenz in den Zellen an der Nachweisgrenze lag.

Die Expression der beiden Melatonin-Rezeptoren wurde ebenfalls analysiert. β -Actin wurde als Referenzgen verwendet. Die Ergebnisse (siehe 5.4) zeigten eine geringe Expression von MT_1 in den Zellen. Durch die geringe Expressionsrate konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Melatoninkonzentration und einer Expression von MT_1 nachgewiesen werden, obwohl die Expression in Anwesenheit von Melatonin geringer erschien. MT_2 konnte mittel der RT-qPCR in den Knochenmarkskulturen nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Melatonin eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel über hat, da Melatonin in geringen Konzentrationen zu einer Reduktion des OC-Wachstums führt, während hohe Konzentrationen von

Melatonin die Bildung von Netzwerken verschiedener Zellen in der Knochenmarkskultur fördert.

MT₁, der in OC und in den OC-Vorläuferzellen in geringer Konzentration exprimiert wird, scheint durch Melatonin vermindert zu werden. Für die in Zusammenarbeit mit TissueGnostics GmbH, Seewald Solutions, sowie der Medizinische Universität Wien entwickelte neue Analysen-Software konnte weiters gezeigt werden, dass die quantitative Analyse zur Bestimmung von mehrkernigen Zellen, wie den OCs, in Zellkulturen hervorragend geeignet ist.

7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1** Bildung der Osteoklasten
- Abbildung 2** Schritte der Knochenresorption durch den Osteoklasten
- Abbildung 3** Struktur von Melatonin
- Abbildung 4** Biosynthese von Melatonin
- Abbildung 5** Metabolismus von Melatonin
- Abbildung 6** Membranstruktur der Melatonin-Rezeptoren MT₁ und MT₂
- Abbildung 7** Effekte von Melatonin auf den Knochen
- Abbildung 8** Beispielbilder der durch TRAP-Färbung dargestellten Osteoklasten
- Abbildung 9** Zahl der OC
- Abbildung 10** Zahl der nicht-Osteoklasten
- Abbildung 11** Verhältnis OC zu nicht-OC
- Abbildung 12** Automatische Bildanalyse von OC
- Abbildung 13** Bild-Analyse einer gesamten Region
- Abbildung 14** OC-Wachstum unter dem Einfluss von Melatonin
- Abbildung 15** Netzbildung unter höheren Melatonin-Konzentrationen
- Abbildung 16** Qualitative Analyse des MT₁-Rezeptors
- Abbildung 17** Δ CT-Werte von MT₁

8. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Risikofaktoren einer Osteoporose
Tabelle 2	Komponenten für den RT 2x Mastermix
Tabelle 3	Temperaturprogramm für die RT
Tabelle 4	β -Actin PCR Primer
Tabelle 5	Komponenten für 12,5 μ l 2x Mastermix (pro Probe)
Tabelle 6	Temperaturprogramm für die PCR
Tabelle 7	Komponenten für 15 μ l Mastermix
Tabelle 8	Gen Expressions Assays
Tabelle 9	Liste der verwendeten primären und sekundären Antikörper
Tabelle 10	Liste der verwendeten Zusätze und Kultur-Bedingungen
Tabelle 11	Ergebnis der OC-Auszählung
Tabelle 12	Ergebnis der nicht-OC-Auszählung
Tabelle 13	Verhältnis von OC zu nichtOC
Tabelle 14	Ergebnis der automatischen Analyse der Anzahl an OC und nicht-OC
Tabelle 15	Ergebnis der automatischen Analyse der Fläche an OC und nicht-OC
Tabelle 16	Konzentration und A 260/280 der verschiedenen Proben
Tabelle 17	β -Aktin und MT ₁ mRNA Expression
Tabelle 18	β -Aktin und MT ₂ mRNA Expression

9. ABKÜRZUNGEN

(¹²⁵I) Mel	(¹²⁵ I) Iodomelatonin
A 260 / 280	Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm
AANAT	Arylalkylamin N-Transferase
AB	Antikörper
AC	Adenylatcyclase
ACTB	β-Actin
AFMK	N-acetyl-N-formyl-5-methoxynuramin
ALP	Alkalische Phosphatase
αMEM-Medium	Minimum essential Medium
BMD	Bone mineral density, Knochenmineraldichte
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	Cyclisches Adenosin Monophosphat
cDNA	komplementäre DANN
CFU-GM	Colony-forming unit for granulocytes and macrophages
CFU-M	Colony-forming unit for macrophages
cGMP	Cyclisches Guanosin Monophosphat
CREB	cAMP-response-element-binding-protein
CSF	Kolonestimulierender-Faktor
CT	Cycle threshold
DAPI	4',6-Diamino-2-Phenylindol
ΔCT	Unterschied zwischen 2 CT-Werten
ΔCT	Unterschied zwischen 2 dCT-Werten
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleinsäure
DNase	Deoxyribonuclease
dNTP	Deoxyribonucleotid
DXA	Dual energy X-ray absorptiometry
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E_n	n-fache Expression
ERK	Extracellular-signal regulated Kinasen
FCS	Fetales Kälberserum

GE	Gelelektrophorese
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GPR50	G-Protein gekoppelter Rezeptor 50
HIOMT	Hydroxyindol-O-Methyltransferase
IF	Immunfluoreszenz
IGF1	Insulin-like growth factor
Konz	Konzentration
MAP	mitogen-activated protein
M-CSF	Macrophage-colony stimulating factor
mRNA	Messenger RNA
MT₁	Melatonin-Rezeptor 1
MT₂	Melatoninrezeptor 2
NA	Noradrenerg
NAS	N-Acetylserotonin
NFATc1	Nuclear factor of activated T-cells
OB	Osteoblast
OC	Osteoklast
OPG	Osteoprotegerin
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PCR Wasser	DNase, RNase, DNA freies Wasser
PenStrep	Penicillin-Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PVN	Paraventriculärer Kern
qPCR	Real time PCR
QR2	Quinone-Reduktase 2
RANK	Receptor activator of nuclear factor-kB
RANKL	Receptor activator of nuclear factor-kB ligand
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonucleinase
RT	Reverse Transkription
RZR / RORα	Retinoid related orphan nuclear recetor

SCG	Superior cervical ganglion
SCN	Suprachiasmatischer Kern
SERM	Selektiver Estrogen-Rezeptor Modulator
SULT	Sulfotransferase
T	Zeit
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TGF β	Transforming growth factor b
TNF	Tumornekrose Faktor
TRAP	Tartrat resistente saure Phosphatase
usw.	und so weiter
UV-Licht	Ultraviolettes-Licht
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel

10. LITERATURANGABEN

1. Deetjen P, S.E.-J., Hescheler J, *Physiologie*. Vol. 4. Auflage. 2005. 188-195.
2. Boyce, B.F. and L. Xing, *Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling*. Arch Biochem Biophys, 2008. **473**(2): p. 139-46.
3. Sims, N.A. and N.C. Walsh, *GP130 cytokines and bone remodelling in health and disease*. BMB Rep, 2010. **43**(8): p. 513-23.
4. Bar-Shavit, Z., *The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell*. J Cell Biochem, 2007. **102**(5): p. 1130-9.
5. Roodman, G.D., *Cell biology of the osteoclast*. Exp Hematol, 1999. **27**(8): p. 1229-41.
6. Gardner, C.R., *Morphological analysis of osteoclastogenesis induced by RANKL in mouse bone marrow cell cultures*. Cell Biol Int, 2007. **31**(7): p. 672-82.
7. Teitelbaum, S.L., *Osteoclasts: what do they do and how do they do it?* Am J Pathol, 2007. **170**(2): p. 427-35.
8. Boyce, B.F., Z. Yao, and L. Xing, *Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2009. **19**(3): p. 171-80.
9. Marini, F. and M.L. Brandi, *Pharmacogenetics of osteoporosis*. F1000 Biol Rep, 2010. **2**: p. 63.
10. Christodoulou, C. and C. Cooper, *What is osteoporosis?* Postgrad Med J, 2003. **79**(929): p. 133-138.
11. Looker, A.C., E.S. Orwoll, C.C. Johnston, R.L. Lindsay, H.W. Wahner, W.L. Dunn, M.S. Calvo, T.B. Harris, and S.P. Heyse, *Prevalence of low femoral bone density in older US adults from NHANES III*. J Bone Miner Res, 1997. **12**(11): p. 1761-1768.
12. Resch, U.P.D.H. www.osteoporose.co.at. [cited 2010 28.12.2010]; Available from: <http://www.osteoporose.co.at/osteoforamen.html>.
13. Akesson, K., *New approaches to pharmacological treatment of osteoporosis*. Bull World Health Organ, 2003. **81**(9): p. 657-64.
14. Roodman, G.D. and J.J. Windle, *Paget disease of bone*. J Clin Invest, 2005. **115**(2): p. 200-8.

15. Balke, M., L. Campanacci, C. Gebert, P. Picci, M. Gibbons, R. Taylor, P. Hogendoorn, J. Kroep, J. Wass, and N. Athanasou, *Bisphosphonate treatment of aggressive primary, recurrent and metastatic Giant Cell Tumour of Bone*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 462.
16. Wulling, M., C. Engels, N. Jesse, M. Werner, G. Delling, and E. Kaiser, *The nature of giant cell tumor of bone*. J Cancer Res Clin Oncol, 2001. **127**(8): p. 467-74.
17. Wuelling, M., C. Engels, N. Jesse, M. Werner, E. Kaiser, and G. Delling, *Histogenesis of giant cell tumors*. Pathologe, 2002. **23**(5): p. 332-339.
18. Blackley, H.R., J.S. Wunder, A.M. Davis, L.M. White, R. Kandel, and R.S. Bell, *Treatment of giant-cell tumors of long bones with curettage and bone-grafting*. J Bone Joint Surg Am, 1999. **81**(6): p. 811-20.
19. Lerner, A.B., J.D. Case, Y. Takahashi, T.H. Lee, and W. Mori, *Isolation of Melatonin, the Pineal Gland Factor That Lightens Melanocytes*. J Am Chem Soc, 1958. **80**(10): p. 2587-2587.
20. Zawilska, J.B., D.J. Skene, and J. Arendt, *Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms*. Pharmacol Rep, 2009. **61**(3): p. 383-410.
21. Tan, D.X., L.C. Manchester, R. Hardeland, S. Lopez-Burillo, J.C. Mayo, R.M. Sainz, and R.J. Reiter, *Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin*. J Pineal Res, 2003. **34**(1): p. 75-8.
22. Arnao, M.B. and J. Hernandez-Ruiz, *The physiological function of melatonin in plants*. Plant Signal Behav, 2006. **1**(3): p. 89-95.
23. Chatteraj, A., T. Liu, L.S. Zhang, Z. Huang, and J. Borjigin, *Melatonin formation in mammals: in vivo perspectives*. Rev Endocr Metab Disord, 2009. **10**(4): p. 237-43.
24. Klein, D.C., *Arylalkylamine N-acetyltransferase: "the Timezyme"*. J Biol Chem, 2007. **282**(7): p. 4233-7.
25. Ganguly, S., S.L. Coon, and D.C. Klein, *Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation*. Cell Tissue Res, 2002. **309**(1): p. 127-37.
26. Ma, X., J.R. Idle, K.W. Krausz, and F.J. Gonzalez, *Metabolism of melatonin by human cytochromes p450*. Drug Metab Dispos, 2005. **33**(4): p. 489-94.

27. Dubocovich, M.L., *Melatonin receptors: are there multiple subtypes?* Trends Pharmacol Sci, 1995. **16**(2): p. 50-6.
28. Jockers, R., P. Maurice, J.A. Boutin, and P. Delagrange, *Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new?* Br J Pharmacol, 2008. **154**(6): p. 1182-95.
29. Ebisawa, T., S. Karne, M.R. Lerner, and S.M. Reppert, *Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from Xenopus dermal melanophores.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(13): p. 6133-7.
30. Ishii, H., N. Tanaka, M. Kobayashi, M. Kato, and Y. Sakuma, *Gene structures, biochemical characterization and distribution of rat melatonin receptors.* J Physiol Sci, 2009. **59**(1): p. 37-47.
31. Hardeland, R., *Melatonin: signaling mechanisms of a pleiotropic agent.* Biofactors, 2009. **35**(2): p. 183-92.
32. Reppert, S.M., D.R. Weaver, and C. Godson, *Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes.* Trends Pharmacol Sci, 1996. **17**(3): p. 100-2.
33. Reppert, S.M., C. Godson, C.D. Mahle, D.R. Weaver, S.A. Slaugenhaupt, and J.F. Gusella, *Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(19): p. 8734-8.
34. Godson, C. and S.M. Reppert, *The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways.* Endocrinology, 1997. **138**(1): p. 397-404.
35. Pandi-Perumal, S.R., I. Trakht, V. Srinivasan, D.W. Spence, G.J. Maestroni, N. Zisapel, and D.P. Cardinali, *Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways.* Prog Neurobiol, 2008. **85**(3): p. 335-53.
36. Nosjean, O., M. Ferro, F. Coge, P. Beauverger, J.M. Henlin, F. Lefoulon, J.L. Fauchere, P. Delagrange, E. Canet, and J.A. Boutin, *Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2.* J Biol Chem, 2000. **275**(40): p. 31311-7.
37. Arendt, J., *Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology.* Rev Reprod, 1998. **3**(1): p. 13-22.

38. Okatani, Y., A. Wakatsuki, R.J. Reiter, and Y. Miyahara, *Melatonin reduces oxidative damage of neural lipids and proteins in senescence-accelerated mouse*. Neurobiol Aging, 2002. **23**(4): p. 639-44.
39. Lartaud, I., S. Faure, A. Tabellion, A.C. Resende, S. Nadaud, D. Bagrel, C. Capdeville-Atkinson, and J. Atkinson, *Melatonin counteracts the loss of agonist-evoked contraction of aortic rings induced by incubation*. Fundam Clin Pharmacol, 2007. **21**(3): p. 273-9.
40. Ceyran, H., F. Narin, N. Narin, H. Akgun, A.B. Ceyran, F. Ozturk, and Y. Akcali, *The effect of high dose melatonin on cardiac ischemia- reperfusion Injury*. Yonsei Med J, 2008. **49**(5): p. 735-41.
41. Tan, D.X. and L.C. Manchester, *Significance of Melatonin in Antioxidative Defense System: Reactions and Products*. Biol Signals Recept, 2000. **9**(3): p. 137-59.
42. Bubenik, G.A. and S.J. Konturek, *Melatonin and aging: prospects for human treatment*. J Physiol Pharmacol, 2011. **62**(1): p. 13-9.
43. Arendt, J. and S.M. Rajaratnam, *Melatonin and its agonists: an update*. Br J Psychiatry, 2008. **193**(4): p. 267-9.
44. Paulis, L. and F. Simko, *Blood pressure modulation and cardiovascular protection by melatonin: potential mechanisms behind*. Physiol Res, 2007. **56**(6): p. 671-84.
45. Cardinali, D.P., M.G. Ladizesky, V. Boggio, R.A. Cutrera, and C. Mautalen, *Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives*. J Pineal Res, 2003. **34**(2): p. 81-7.
46. Conti, A., S. Conconi, E. Hertens, K. Skwarlo-Sonta, M. Markowska, and J.M. Maestroni, *Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells*. J Pineal Res, 2000. **28**(4): p. 193-202.
47. Koyama, H., O. Nakade, Y. Takada, T. Kaku, and K.H.W. Lau, *Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation*. Journal of Bone and Mineral Research, 2002. **17**(7): p. 1219-1229.
48. Histing, T., C. Anton, C. Scheuer, P. Garcia, J.H. Holstein, M. Klein, R. Matthys, T. Pohlemann, and M.D. Menger, *Melatonin Impairs Fracture*

- Healing by Suppressing RANKL-Mediated Bone Remodeling. J Surg Res*, 2010.
49. Suzuki, N. and A. Hattori, *Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish. J Pineal Res*, 2002. **33**(4): p. 253-8.
 50. Ladizesky, M.G., V. Boggio, L.E. Albornoz, P.O. Castrillon, C. Mautalen, and D.P. Cardinali, *Melatonin increases oestradiol-induced bone formation in ovariectomized rats. J Pineal Res*, 2003. **34**(2): p. 143-51.
 51. Suzuki, N., M. Somei, K. Kitamura, R.J. Reiter, and A. Hattori, *Novel bromomelatonin derivatives suppress osteoclastic activity and increase osteoblastic activity: implications for the treatment of bone diseases. J Pineal Res*, 2008. **44**(3): p. 326-34.
 52. Pietschmann P., *Principles of Osteoimmunology: Molecular Mechanisms and Clinical Applications*. Springer Verlag, 2012. 27-46.
 53. Peglab. peqGOLD TriFast - *Optimierte Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode für die gleichzeitige Extraktion von RNA, DNA und Proteinen*. [cited 2010 06/21]; Available from: http://www.peglab.de/wcms/de/pdf/30-2010_m.pdf.
 54. Ishii, H., Tanaka, N., Kobayashi, M., Kato, M., and Sakuma, Y., *Gene structures, biochemical characterization and distribution of rat melatonin receptors. J Physiol Sci*, 2009. 59(1): p. 37-47.

11. LEBENS LAUF

Angaben zur Person

Name	BURGER Kathrin
Adresse	Heldenplatz 13, 2440 Reisenberg
Geburtsdatum	31.12.1985
Geburtsort	Mödling
Staatsbürgerschaft	Ö
Glaubensbekenntnis	röm-kath

Schul- und Berufsbildung

1992-1996	Volksschule Reisenberg
1996-2004	Don Bosco Gymnasium Unterwaltersdorf
seit 2004	Pharmazie-Studium, 1090 Wien
Wintersemester 2010	Diplomarbeit, AKH-Wien, Institut für Pathophysiologie
Februar, Juli, August 2011	Dokumentationsassistentin, AKH-Wien, Institut für Pathophysiologie
Juli, August 2004	Ferialpraxis, Raffael Donner Apotheke, 1220 Wien