



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Einfluß von Melatonin auf die Differenzierung der
Osteoklasten mittels quantitativer Imageanalyse“

Verfasserin

Dilek Kalayci

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

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

Danksagung

Diese Diplomarbeit entstand von März 2011 bis Juli 2011 am Institut für Pathophysiologie und Allergieforschung am AKH Wien im Rahmen des Bridge Projekts.

Ich möchte mich bei der Frau Ao. Univ. Prof. Dr. Theresia Thalhammer und bei Herrn Ao. Univ. Prof. Dr. Walter Jäger für die Vermittlung des Arbeitsplatzes und für die fachliche Unterstützung herzlich bedanken.

Außerdem möchte ich mich beim Herrn Mag. Martin Schepelmann und bei Florian Schadauer für das freundliche Zusammenarbeiten bei der Durchführung des praktischen Teils bedanken.

Ein herzliches großes Dankeschön gilt meinen Eltern Zeynep und Ziya Kalayci. Ich möchte diese Gelegenheit nutzen um mich bei meiner Mutter Zeynep und bei meinem Vater Ziya für die moralische Unterstützung während meiner Studienzeit zu bedanken.

INHALTSVERZEICHNIS

1 Problemstellung	1
2 Einleitung.....	3
2.1 Knochen	3
2.1.1 Knochenaufbau	3
2.1.2 Knochenfunktion	3
2.2 Knochenzellen	4
2.2.1 Osteoklasten.....	4
2.2.2 Osteoblasten	5
2.2.3 Osteozyten.....	5
2.3 Osteoclastogenese	5
2.3.1 Steuerung der Knochenresorption durch Hormone und Gewebefaktoren.....	8
2.3.2 Osteoklastenaktivität beeinflussende Gewebefaktoren	9
2.4 Hormone im Knochenstoffwechsel.....	10
2.4.1 Parathormon (PTH)	10
2.4.2 Calcitonin	11
2.5 Osteoklasten-assoziierte Krankheiten.....	11
2.5.1 Osteoporose	11
2.5.2 Morbus Paget.....	13
2.5.3 Riesenzelltumore	13
2.5.4 Rheumatoide Arthritis.....	14
2.5.5 Knochenmetastasen und Osteosarkom	15
2.6 Melatonin	16
2.6.1 Allgemeines	16
2.6.2 Biosynthese	17
2.6.3 Metabolismus zu Kynuraminderivaten	19
2.6.4 Melatonin-Rezeptoren.....	19
2.6.5 Melatoninwirkungen auf die Knochen.....	20
3 Material und Methoden	22
3.1 Gewinnung von Zellen aus Mausknorpelmark.....	22
3.1.1 Präparation der Knochen.....	23
3.2 Kultivierung der Osteoklasten	24
3.2.1 Sterilisation der Deckgläser	24
3.2.2 Zellzählung am Zellzählgerät (Coulter Counter)	25

3.2.3 Vorbereiten des Nährmediums.....	26
3.3 Immunfluoreszenzfärbung.....	29
3.3.1 Prinzip.....	29
3.3.2 Vorbereitung	30
3.3.3 Durchführung.....	31
3.4 TRAP (Tartrat-resistente saure Phosphatase) - Färbung	34
3.4.1 Prinzip.....	34
3.5 Kultivierung der RAW 264.7 Zellen	35
4 Ergebnisse und Diskussion.....	37
4.1 Optimierung der Osteoklastenkultur	37
4.2 Automatische Quantifizierung mehrkerniger Osteoklasten	37
4.3 Wirkung von Melatonin auf das Osteoklastenwachstum.....	39
4.4 Differenzierung der RAW 264.7 Zelllinie	40
4.4.1. Riesenosteoklasten bei RAW 264.7 Zellen	41
4.5 Variabilität in der Kultivierung von Osteoklasten	43
4.6 Automatischen Quantifizierung versus manuelle Auswertung	45
5 Zusammenfassung.....	47
6 Abstract.....	48
7 Literaturverzeichnis	49
8 Abbildungsverzeichnis	53
9 Tabellenverzeichnis	54
10 Curriculum Vitae.....	55

1 Problemstellung

Knochen unterliegen einem intensiven Stoffwechsel. Sie werden durch die knochenaufbauenden Osteoblasten und knochenabbauenden Osteoklasten ständig umgebaut und erneuert.

Osteoklasten sind vielkernige (>3 Kerne) Zellen, die durch die Expression der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP) charakterisiert werden. TRAP ist ein wichtiges Enzym, das noch zusätzlich für die Osteoklastenaktivität und -Zahl herangezogen wird. TRAP Färbung ist einfach und schnell durchzuführen. Anschließend werden die gefärbten Zellen im Mikroskop manuell gezählt. Der Nachteil dieser Methode ist, dass die Zellen für weitere Analyse mittels Immunfluoreszenzfärbung nicht weiterverwendet werden. Darüber hinaus dauert die Auswertung lange und es besteht die Gefahr des falschen Auszählens. Daher wäre ein automatisches Imageanalysesystem wünschenswert.

Die Multinuklearität ist aber ein großes Problem bei der automatischen Imageanalyse zur Bestimmung der Osteoklastenzahl. In den derzeitigen Auswertesystemen wird der Zellkern als Erkennungsmerkmal für eine Zelle herangezogen.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollten Osteoklasten gezüchtet und durch Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht werden. Die Immunfluoreszenzfärbung soll so durchgeführt werden, dass man Osteoklasten als eigene Zelle von anderen Zellen in der Kultur trennen kann. Spezifische Antigene, die in der Zellwand und Tubulin, das im Zytoskelett lokalisiert sind, werden angefärbt. Die Antikörper sind gegen den Calcitoninrezeptor, α -Tubulin und zur Unterscheidung der Osteoklasten von Makrophagenvorläuferzellen gegen das Makrophagenantigen F4/80, gerichtet.

Die Evaluierung dieses Programms sollte im Rahmen der Diplomarbeit erfolgen, wobei die Wirkung von Melatonin auf das Osteoklastenwachstum bestimmt werden sollte. Die Etablierung eines automatischen Aufnahme- und Auswertesystems für mehrkernige Zellen ist für die Untersuchung von Krankheiten, die mit veränderten Osteoklastenzahlen einhergehen, sehr wichtig. Damit könnten verschiedene Arzneistoffe, die auf Osteoklasten und andere mehrkernigen Zellen wirken, präzise

und schnell analysiert werden und ihre Wirkung auf Proteine in Osteoklasten bestimmt werden.

2 Einleitung

2.1 Knochen

Das menschliche Skelett besteht ungefähr aus 200 Knochen. Die Mehrheit der Knochen wird erst nach der Geburt zu reifen Knochen entwickelt. Die dienen zur Stabilität und Beweglichkeit des Körpers und sind für die Homöostase des Kalziumhaushalts wichtig. In der Wachstumsphase und im Erwachsenenalter kommt es zum ständigen Umbau des Knochens, wobei die Wachstumsphase sehr wichtig ist, da 90 % der Knochen in dieser Phase gebildet werden. Im Erwachsenenalter nimmt die Knochendichte langsam zu und im fortgeschrittenen Alter wieder ab.^{1,2}

2.1.1 Knochenaufbau

Am Knochen lassen sich drei Bereiche unterscheiden. Der mittlere Bereich wird Diaphyse und die beiden Enden Epiphyse genannt. Den Teil zwischen Diaphyse und Epiphyse bezeichnet man als Metaphyse. Die Oberfläche der Epiphyse ist mit Knorpelgewebe umgeben und den Rest überzieht das sogenannte Periost, das sehr schmerzempfindlich ist. Für die Versorgung des Knochens sind Blutgefäße und Nerven zuständig, sie sich am Periost befinden. Der innere Teil des Knochens ist aus Knochenbälkchen (Trabekel). Aufgrund der Hohlraumstruktur findet man im inneren Teil das rote Knochenmark, das als das blutbildende Organ bekannt ist.¹

2.1.2 Knochenfunktion

Das Skelett, das aus 200 Knochen aufgebaut ist, hat vier Funktionen: Stütz- und Bewegungsfunktion, Schutzfunktion, Blutzellenproduktion und Speicherfunktion.³

Stütz und Bewegungsfunktion

Das Skelett besteht aus den Stamm- und Extremitätenknochen. Während der Kopf und der Rumpf zum Stammskelett gezählt werden, gehören Arme, Beine, Beckengürtel und Schulter zu Extremitäten. Das Skelett erfüllt Stützfunktion für Extremitäten und Rumpf und besitzt Ursprungsstellen für die Beweglichkeit³

Schutzfunktion

Eine der wichtigsten Funktionen ist die Schutzfunktion. Vor äußeren Einflüssen werden die Organe von den Knochen geschützt zb das Herz und die Lunge werden von Rippen geschützt.³

Blutzellenproduktion

Im Innenraum der Knochen findet man das Knochenmark, das als der Bildungsort der roten Blutkörperchen, der weißen Blutkörperchen und der Blutplättchen bezeichnet wird.³

Speicherfunktion

Die Knochen besitzen Magnesium, Calcium und Phosphat. Im Notfall werden die Mineralien im Knochen mobilisiert und freigesetzt. Einlagerung und Freisetzung von Calcium werden über Vitamin D und das Parathormon geregelt.³

2.2 Knochenzellen

Man unterscheidet zwischen drei Knochenzellen: Osteoklasten, Osteoblasten und Osteozyten.

2.2.1 Osteoklasten

Osteoklasten, die als knochenabbauende Zellen wirken, gehören zu vielkernigen Zellen und werden aus hämatopoetischen Stammzellen abgeleitet. Einkernige Osteoklastenvorläuferzellen haften an der Matrix und verschmelzen miteinander zu mehrkernigen Osteoklasten. Die reifen Osteoklasten besitzen mindestens 3 Kerne, können aber bis zu 100 Kerne aufweisen. Die Osteoklasten besitzen Ausläufer, mit denen sie in die Resorptionslakune eindringen und die Knochenmatrix resorbieren. Die Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) und der Calcitoninrezeptor (CTR) sind typische Marker für die Erkennung der knochenabbauenden Zellen.¹⁵ Sie setzen bestimmte Enzyme frei, die die Mineralien freisetzen und den Knochenmatrix auflösen. Wie die Osteoblasten wird ihre Funktion von vielen Hormonen reguliert. Östrogene, Parathormon und Schilddrüsenhormone wirken auf Osteoklasten und auch bestimmte Zytokine und Wachstumsfaktoren steuern ihre Funktion. Zum Beispiel wurden Östrogenrezeptoren auf Osteoklasten nachgewiesen. Durch

Bindung an diese Rezeptoren können die Östrogene das Osteoklastenwachstum hemmen. Dies ist die Ursache, dass bei Frauen nach der Menopause meist eine erhöhte Osteoklastenaktivität nachzuweisen ist.^{3,4,5}

2.2.2 Osteoblasten

Osteoblasten, die auch als knochenaufbauende Zellen bezeichnet werden, werden von mesenchymalen Stammzellen abgeleitet. Sie bewirken den Aufbau von Knochenmatrix. Sie differenzieren zu den mineralisierten Osteocyten. Die Regulation der Osteoblastentätigkeit erfolgt durch Parathormon, Östrogene und andere Steroidhormone.^{1,3,5}

2.2.3 Osteozyten

Osteozyten, die auch als knochenüberwachende Zellen genannt werden, stammen aus Osteoblasten. Durch ihre Zellfortsätze sind sie mit anderen Osteozyten in Kontakt. Diese Zellen haben auch eine wichtige Rolle beim Transport wichtiger Nährstoffe im Inneren der Knochen.^{3,5}

2.3 Osteoclastogenese

Osteoklasten, die auch als mehrkernige Zellen bezeichnet werden, stammen aus den hämatopoetischen Stammzellen ab. Die Osteoblasten hingegen werden aus der mesenchymalen Stammzellen abgeleitet (siehe Abbildung 1). Störungen der Osteoklastenfunktion sind mit verschiedenen Krankheiten assoziiert. Allerdings sind noch nicht alle Mechanismen der Osteoklastendifferenzierung aufgeklärt.¹⁵

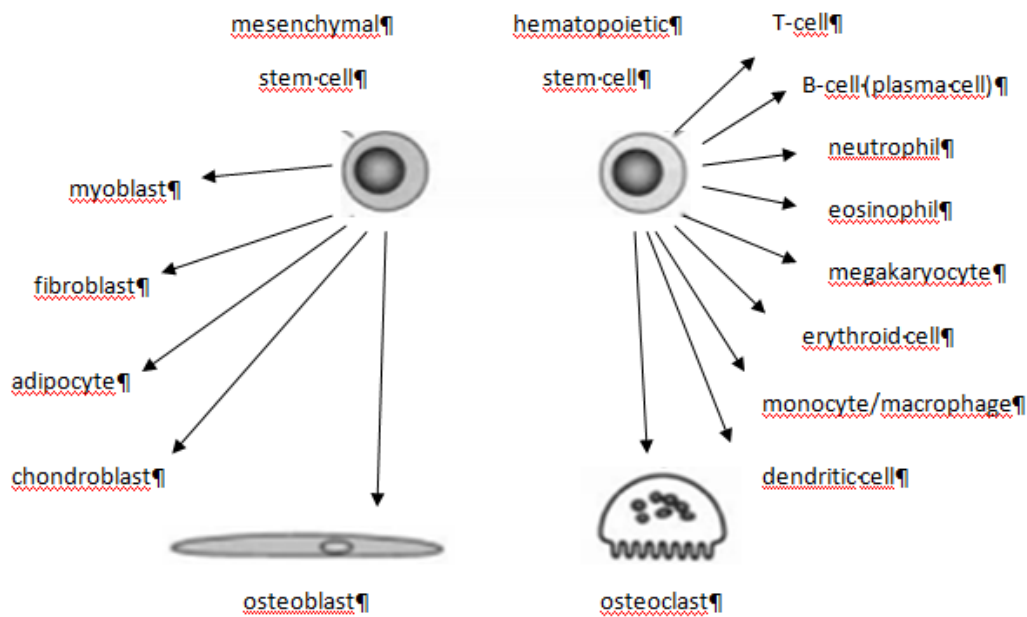


Abb.1: Differenzierungsweg von Osteoklasten und Osteoblasten aus mesenchymalen und hämatopoetischen Stammzellen: Osteoblasten und Osteoklasten stammen aus verschiedenen Zelllinien. Osteoklasten werden von hämatopoetischen Stammzellen abgeleitet, hingegen stammen die Osteoblasten aus mesenchymalen Stammzellen. Weitere Zellen, die aus mesenchymalen Stammzellen abstammen, sind Myoblasten, Fibroblasten, Adipozyten und Chondroblasten. Hingegen bilden sich T-Zellen, B-Zellen, Neutrophilen, Eosinophilen, Megakaryozyten, Erythrozyten, Monozyten/Makrophagen und dendritische Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen.¹⁵

Mit Hilfe von *in vitro* Kulturen, in denen murine Stromazellen des Knochenmarks und Osteoblasten mit Osteoklasten-Vorläuferzellen unter dem Einfluß von verschiedenen Faktoren kultiviert werden, kann man den Ablauf der Osteoklastogenese nachvollziehen. Durch das Zusammenspiel von Stromazellen und Osteoklasten-Vorläuferzellen kommt es zur Bildung von reifen Osteoklasten. So wurde es bewiesen, dass Moleküle auf den Stroma-Zellen für die Stimulierung der Osteoklastendifferenzierung wichtig sind. Es wurden zwei aus Stroma isolierte Gewebefaktoren identifiziert: Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) und Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF). RANKL, der auch als Osteoklasten-Differenzierungsfaktor (ODF) oder Osteoprotegerin Ligand (OPGL) bezeichnet wird, ist ein Typ 2 Transmembranprotein und ein Mitglied der TNF α Superfamilie. M-CSF wird ebenfalls von Osteoblasten und Stromazellen

produziert. Beide Mediatoren liegen als membrangebundene und lösliche Isoformen vor. RANK und c-fms, die auf den Osteoklasten-Vorläuferzellen lokalisiert sind, sind die Rezeptoren für RANKL und M-CSF. Durch das Entfernen von RANKL (Tnfsf11) oder RANK (Tnfsf11a) Gene wird die Osteoklastenaktivität gehemmt. *In vivo* Differenzierung der Osteoklasten findet auf der Knochenoberfläche statt und erfordert einen engen Kontakt zwischen Osteoklasten-Vorläuferzellen, Osteoblasten und Stromazellen.^{4,15}

RANKL wird unter den Einfluß verschiedener Faktoren wie 1,25(OH)₂ Vitamin D₃, Parathormon, IL-1, Prostaglandine gebildet. Einkernige Osteoklasten exprimieren Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP), Cathepsin K (CATK), Calcitonin-Rezeptor (CTR), Vitronectinrezeptor und MMP-9. RANKL besitzt zwei Rezeptoren, RANK und Osteoprotegerin (OPG). OPG, die wie RANKL von Osteoblasten, Stromazellen und anderen Zelltypen produziert wird, blockiert als löslicher Rezeptor für RANKL die Osteoklastogenese durch Verhinderung der RANK-Aktivierung durch RANKL. Das Gleichgewicht der Expression zwischen RANKL und OPG ist wichtig für die Differenzierung der Osteoklasten.

RANKL-RANK Signalweg führt zur Expression von Osteoklasten, aber in diesem Stadium haben Zellen noch nicht den multinukleären Phänotyp von reifen Osteoklasten erhalten. Fusion dieser Zellen ist notwendig für die Bildung von vielkernigen Osteoklasten. Zellverschmelzung ist nicht ein typisches Osteoklastenmerkmal. Zellfusionen werden auch in anderen Gewebetypen wie der Plazenta beobachtet, wo sich ein Zellverband bildet. Der Mechanismus der Zellverschmelzung ist noch nicht aufgeklärt.^{4,15}

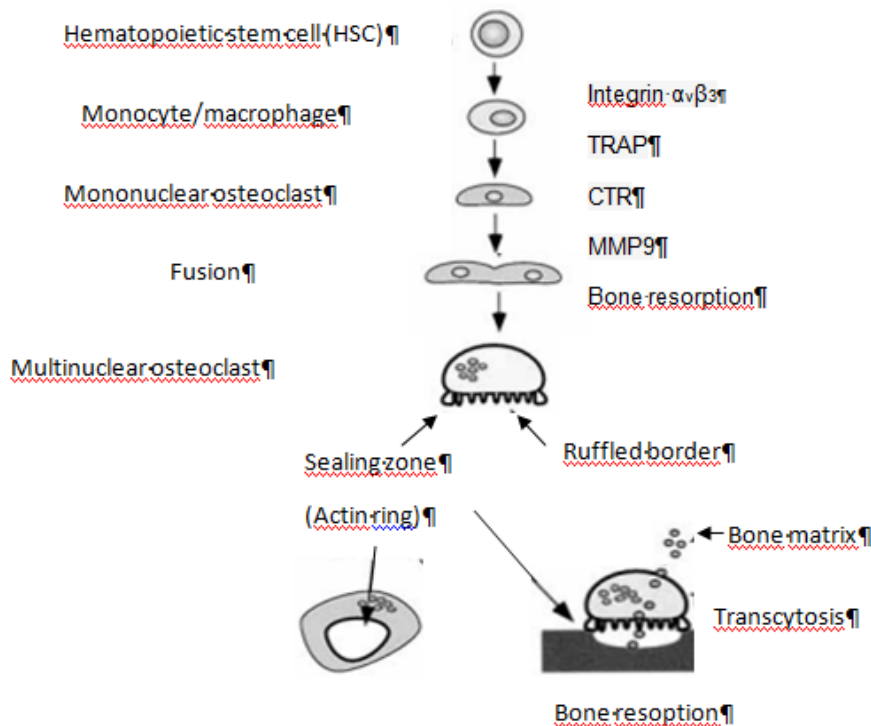


Abb.2: Entwicklung von Osteoklasten aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC): Von HSC über Monozyten/Makrophagen differenzieren sich die Zellen in einkernige Osteoklasten, die verschiedene Moleküle wie Integrin $\alpha_v\beta_3$, TRAP, CTR und MMP9 exprimieren. Mononukleäre Osteoklasten besitzen knochenresorbierende Funktion und verschmelzen miteinander um mehrkernige Osteoklasten zu bilden.¹⁵

2.3.1 Steuerung der Knochenresorption durch Hormone und Gewebefaktoren

Die Aktivität der Osteoklasten und Calcium Homöostase werden durch die Hormone, Zytokine und andere biologischen Faktoren beeinflusst. Pro-resorptive Faktoren sind für die Differenzierung und Aktivität der Osteoklasten durch Hochregulation von RANKL verantwortlich. Umgekehrt kommt es durch Stimulierung der antiresorptiven Faktoren zu einer Downregulation von RANKL und einer Upregulation von OPG. Pro-resorptive Faktoren sind verschiedene Faktoren (IL-1, IL-6, IL-11, TNF- α) 1,25(OH) $_2$ Vitamin D $_3$, PTH, PTH-related Peptide, und Kortikosteroide. Zu den erhöhten Expression von Osteoprotegerin führende Faktoren zählen Zytokine, einschließlich TNF- α , IL-1 α , IL-18, TGF- β , Thrombopoietin, Platelet derived growth factor (PDGF), Steroidhormone wie 17 β -Estradiol.^{4,17}

2.3.2 Osteoklastenaktivität beeinflussende Gewebefaktoren

Interleukin 1

Interleukin 1 ist ein stimulierender Faktor der Knochenresorption, der von Monozyten, Makrophagen, Bindegewebszellen und Osteoklasten produziert wird. Die Mechanismen dieser erhöhten Knochenresorption durch Interleukin-1 ist noch nicht völlig aufgeklärt. Es wurde allerdings gezeigt, dass Interleukin-1 zu einer verstärkten Aktivität einzelner Osteoklasten und/oder einer erhöhten Zahl von Osteoklasten führt, was mit einer erhöhten Knochenresorption einhergehen kann.^{6,18}

M-CSF

Laut den Ergebnissen der Studien spielt M-CSF drei wichtige Rollen in der Osteoklastendifferenzierung. M-CSF induziert RANK, ist ein wichtiger Faktor der Zelldifferenzierung und stimuliert das Überleben und die Proliferation der Zellen. Dabei ist die Stimulierung von RANK durch M-CSF höher als die durch IL-3 und GM-CSF¹⁹

Transforming growth factor alpha (TGF- α)

TGF- α ist ein Polypeptid, das auch von Tumorzellen produziert wird. Es wird verstärkt von knochenabbauenden Tumoren, die mit Hyperkalzämie assoziiert sind, produziert. Durch Bindung an den Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) kann TGF- α die Knochenresorption stimulieren. In einer Studie wurde gezeigt, dass es durch den Zusatz von TGF- α und 1,25-Dihydroxyvitamin D3 zu einer deutlichen Erhöhung der Osteoklastenzahl kommt. Autoradiographische Studien belegen, dass TGF- α die Proliferation der Vorläuferzellen für mehrkernige Zellen stimuliert und 1,25-Dihydroxyvitamin D3 die Fusionsrate der Vorläuferzellen erhöht.²⁰

TNF α und auch Transforming growth factor β (TNF β) stimulieren die Bildung von Osteoklasten-ähnlichen mehrkernigen Zellen. Sie haben auch einen Einfluss auf die Aktivität der reifen Osteoklasten. Eine Studie zeigte, dass die Inkubation reifer Osteoklasten und Osteoblasten mit IL-1 oder TNF die Knochenresorption stimuliert.

TNF potenziert die Wirkung von IL-1. TNF- α , TNF- β und IL-1 wirken bereits in sehr geringen Konzentrationen.^{6,18}

TGF- β zählt zu den wichtigsten Faktoren der Knochenbildung. Es wird von Osteoklasten und Osteoblasten freigesetzt. TGF β kann als autokriner Faktor handeln und so die Knochenbildung durch eine verstärkte Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten stimulieren. Außerdem hemmt der Faktor die Funktion und Bildung der Osteoklasten.^{6,21}

Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid ist ein multifunktionales Molekül, das viele unterschiedliche Funktionen in verschiedenen Geweben hat. Es ist auch für die Knochenfunktion wichtig. Eine Studie hat gezeigt, dass Stickstoffmonoxid zu einer Hemmung der Knochenresorption führt, indem es die Osteoklastenfunktion beeinträchtigt⁶. Es wurde auch gezeigt, dass eine Hemmung der Stickstoffmonoxid-Synthase bei Ratten in vivo die Knochenresorption steigert.^{6,22}

Osteoprotegerin (OPG)

Osteoprotegerin, auch Osteoklasten hemmender Faktor genannt, wird von knochenbauenden Zellen freigesetzt. Das Protein wurde als Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie identifiziert. Es konkurriert mit RANKL um den Rezeptor RANK auf den Osteoklasten. Durch die Bindung von Osteoprotegerin an RANK wird die Aktivität und Differenzierung der Osteoklasten gehemmt.^{6,7,24}

2.4 Hormone im Knochenstoffwechsel

2.4.1 Parathormon (PTH)

PTH ist ein Peptid aus 84 Aminosäuren, das in der Nebenschilddrüse gebildet und gespeichert wird. Es dient zur Aufrechterhaltung der Plasma Ca^{++} Konzentration. Wenn der Calcium-Gehalt im Blut absinkt, wird es in der Nebenschilddrüse freigesetzt. PTH setzt Calcium aus den Knochen frei und fördert die Rückresorption

in den Nieren. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung der Calcium-Konzentration. Umgekehrt kommt es bei Erhöhung der extrazellulären Ca^{++} Konzentration zu einer Hemmung der PTH-Ausschüttung. Außerdem begünstigt das Parathormon die Phosphatausscheidung über die Niere. Das Parathormon reguliert gemeinsam mit Calcitriol die Ca^{++} und Phosphat Konzentration.^{6,9}

2.4.2 Calcitonin

Calcitonin ist ein Polypeptid, das aus 32 Aminosäuren aufgebaut ist. Der Bildungsort ist die C-Zellen der Schilddrüse. Bei einer Erhöhung der Calcium-Konzentration wird Calcitonin freigesetzt. Durch die Wirkung des Calcitonins wird die Osteoklastenaktivität und Mobilisierung von Calcium aus dem Knochen gehemmt. Calcitoninrezeptoren werden von Osteoklastenvorläuferzellen und reifen Osteoklasten exprimiert.²⁵ Der Reiz für die Hormonfreisetzung wird auch durch Glucagon, Gastrin, Östrogene und Cholecystokinin induziert.

In der Therapie findet das synthetische Calcitonin Anwendung. Es wird parenteral appliziert und hat eine Halbwertszeit von 80 min und wird daher langsamer aus dem Blut ausgeschieden. Dagegen ist das Human-Calcitonin mit einer Halbwertszeit von 40 min weniger wirksam.^{9,10}

2.5 Osteoklasten-assoziierte Krankheiten

2.5.1 Osteoporose

Osteoporose, die heute zu den wichtigsten Volkskrankheiten zählt, ist eine Krankheit, die über viele Jahre unauffällig fortschreitet. Es kann jeden betreffen, unabhängig von Geschlecht und Alter. Die Krankheit wird durch die Verminderung der Knochendichte und Verschlechterung der Mikroarchitektur der Knochen charakterisiert. Die Folge ist eine zunehmende Brüchigkeit und häufiges Auftreten von Frakturen. Die Knochendichte ist ein Maß für die Festigkeit der Knochen. Der osteoporotische Knochen wird im Inneren geschädigt. Wenn die Knochendichte niedrig ist, steigt das Risiko der Brüchigkeit.

Zu den Risikofaktoren zählen:

- chronischer Bewegungsmangel

- übermäßige sportliche Aktivität
- Untergewicht
- depressive Stimmungslage
- Rauchen
- Alkoholismus
- Fehlernährung
- Medikamente (Kortison und seine Derivate)

Das größte Risiko für Osteoporose tragen Frauen nach der Menopause. Seit langer Zeit ist die schützende Wirkung von Östrogen bekannt. Östrogen hemmt die Osteoklastogenese und Osteoklastenaktivierung. Bisphosphonate zählen zu den wichtigsten Inhibitoren der Knochenresorption, die für die Behandlung von Osteoporose, Paget-Krankheit, Knochenmetastasen und anderen Knochenkrankheiten verwendet werden. Es ist bekannt, dass Bisphosphonate die Apoptose von Osteoklasten einleiten und ihre Aktivität reduzieren.²⁶ Hormon-Ersatz-Therapie ist eine andere Möglichkeit um Osteoporose zu heilen. Sie kann in Form von Östrogen/Gestagen-Therapie oder selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs) sein. Für Frauen nach der Menopause verbessert die Hormontherapie die Knochendichte um bis zu 7 % und sie reduziert das Risiko für Wirbel- und Hüftfrakturen. Die Therapie sollte aber innerhalb von fünf Jahren nach Beginn der Wechseljahre beginnen. Das ist die Zeit des größten Knochenschwunds. Allerdings ist eine längere Hormontherapie selten empfehlenswert, da das Risiko für Schlaganfall, tiefe Venenthrombose und Brustkrebs erhöht ist. Eine Alternative zu Östrogen/Gestagen-Therapie stellen die Gabe der SERMs dar. Sie wirken Östrogen-Rezeptor agonistisch in den Knochen und antagonistisch im Brustgewebe. Raloxifen, ein SERM, reduziert den postmenopausalen Knochenschwund und das Risiko für Brustkrebs, aber die Risiken für tiefe Venenthrombosen und Schlaganfall werden nicht reduziert.^{2,4} Im Gegensatz zu einer Östrogentherapie erhöht Raloxifen nicht das Risiko an einem Endometriumkarzinom zu erkranken. Während Östrogen und eine Kombination von Östrogen-Gestagen Produkten nur für die Prävention der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen zugelassen sind, ist Raloxifen für die Behandlung und Prävention der postmenopausalen Osteoporose zugelassen.²⁷

2.5.2 Morbus Paget

Morbus Paget ist eine Krankheit, die chronisch und nicht entzündlich abläuft und durch einen Knochenumbau gekennzeichnet ist. Die Krankheit kann jeden Knochen betreffen, meistens sind aber die Beckenknochen, der Schädel, die Röhrenknochen und das Achsenskelett befallen. Man unterscheidet drei typische Stadien:

Stadium 1: Die Krankheit läuft im Anfangsstadium bei 90 % der Patienten ohne Symptome. Diese Frühphase wird radiologisch diagnostiziert. In diesem Stadium ist die alkalische Phosphatase im Normalbereich.

Stadium 2: Erst im mittleren Stadium haben die Patienten Knochenschmerzen. Das Röntgenbild zeigt typische Merkmale. In dieser Phase kommt es zu einer erhöhten Osteoblastenaktivität. Man sieht aber auch große vielkernige Osteoklasten. Als Folge davon wird das charakteristische mosaikartige Bild dieser Erkrankung erkennbar.

Stadium 3: Die dritte Phase ist durch die deutlichen Deformierungen der betroffenen Knochenbereiche gekennzeichnet. Im späteren Verlauf der Krankheit kann eine maligne Entartung eintreten. Im kranken Knochen werden vor allem Osteosarkome und Riesenzelltumore festgestellt.

Bei Morbus Paget wird zwischen systemischer und lokaler Therapie unterschieden. Das Ziel der systemischen Behandlung ist die Hemmung der Osteoklastenaktivität. Es werden Bisphosphonate und Calcitonine eingesetzt. Die lokale Therapie besteht aus einer physikalischen Behandlung, Krankengymnastik, Massagen oder Balneotherapie. Gegen Schmerzen werden meistens nicht-steroidale Antiphlogistika verabreicht.¹¹

2.5.3 Riesenzelltumore

Der Riesenzelltumor ist ein lokal aggressiver Tumor, der vor allem an den Enden der Knochen mit ihrem Hauptzentrum in der Epiphyse der Röhrenknochen lokalisiert ist.²⁹ Diese Tumore sind durch die Anwesenheit von großen Riesenzellen gekennzeichnet. Riesenzelltumore, die einen hohen Anteil an osteoklastenähnlichen, vielkernigen Riesenzellen besitzen, werden sie auch als Osteosarkom genannt. Diese Tumorart weist drei verschiedene Zelltypen auf: runde, spindelförmige einkernige Zellen und mehrkernige osteoklastenähnliche Riesenzellen.²⁸ Starke

Schmerzen und Schwellung sind die charakteristischen Symptome. Diese Krankheit wird vor allem bei jungen Patienten, bei denen die Wachstumsfugen geschlossen sind, diagnostiziert. Bis jetzt konnte aber die Histogenese und die Verbindung der verschiedenen Zelltypen nicht genau interpretiert werden. Durch die Kultivierung der Zellen aus dem Tumorgewebe wurden die Stromazellen entdeckt. Es gibt Beweise, dass die Stromazellen, die die große Mehrheit der mononukleären Zellpopulation aufweisen, den wahren neoplastischen Teil des Tumors repräsentieren und die Eigenschaft der Proliferation besitzen. Durch die Identifizierung des Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) im Tumor wurde gezeigt dass Monocyten im Tumorgewebe ansiedeln und sich zu multinukleären Riesenzellen entwickeln.³⁰

Es gibt die Hypothese, dass sich auch Stromazellen aus Osteoblastenvorläuferzellen entwickeln können und gemeinsam auf die Bildung der Riesenzellen wirken. Wie die Monozyten stammen die knochenabbauenden vielkernigen Riesenzellen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen, die nach wie vor monozytäre Marker tragen.

Die mehrkernigen Riesenzellen haben ähnliche biochemische, physiologische und funktionelle Eigenschaften wie die normalen Osteoklasten. Sie produzieren TRAP, Calcitoninrezeptor, Vitronektinrezeptor und eine H⁺-ATPase. Sie lösen die Matrix der Knochen auf.³¹ Durch die unterschiedlichen Fusionsraten werden die beiden Zelltypen voneinander unterschieden. Die vielkernigen Riesenzellen haben um die 100 Zellkerne, während die normalen Osteoklasten 3-5 Zellkerne besitzen.

Aufgrund der Produktion der Matrix-Metalloproteinasen MMP2, MMP3 und MMP9 verhalten sich die Riesenzelltumore aggressiv. Diese Metalloproteinasen verursachen eine Zerstörung der Knochenmatrix. Verschiedene Zytokine, vor allem Interleukin 1, beeinflussen die Expression der Metalloproteinasen.^{33,12}

2.5.4 Rheumatoide Arthritis

Rheumatoide Arthritis ist eine chronische Erkrankung, die durch eine Entzündung der Synovialis gekennzeichnet ist. Eine proliferative Synovitis führt zu einer Zerstörung von Gelenkknorpel und Knochen. Die Ursache der rheumatoiden Arthritis wurde bis jetzt nicht aufgeklärt, doch es wird angenommen, dass die Autoimmunität bei der Entstehung der Krankheit eine wichtige Rolle spielen muss. Durch die Aktivierung

von CD4+-Lymphozyten werden die proinflammatorischen wirkenden Zytokine wie TNF- α , IL-17 und IL-1 freigesetzt, die zur Zerstörung der Knochen und Knorpel führen. T-Lymphozyten und synoviale Fibroblasten dienen als zusätzliche Quellen für RANKL bei rheumatoider Arthritis. Außerdem produziert eine Untergruppe von T-Helferzellen, TH 17 Zellen, IL-17. Während IL-17 eine wichtige Rolle in Autoimmunität und chronische Entzündungen spielt, stimuliert es auch den Knochenumbau und erhöht die Knochenresorption.³⁵ TH17 Zellen exprimieren mehr RANKL als TH1 Zellen. Studien beweisen, dass RANKL ein wichtiger Faktor der Osteoklastenbildung von Zellen in rheumatischen Gelenkserkrankungen ist und das Osteoprotegerin den Knochenabbau verhindert. Bei rheumatoider Arthritis ist das RANKL-OPG Verhältnis verändert. Es kommt zu einer gesteigerten RANKL-Konzentration, was die Osteoklastenaktivität steigert.³⁶ Die RANKL-RANK-OPG Interaktion wurde als Ziel für die Verringerung der Knochenverlust bei rheumatoider Arthritis untersucht. In einem murinen Modell konnte OPG die Knochen- und Knorpelzerstörung hemmen, nicht aber die Synovitis. In einer anderen Studie wurde eine TNF-abhängige Arthritis mit den Bisphosphonaten Pamidronat und Zoledronat behandelt und die Mäuse zeigten Synovitis ohne Knochenverlust. Therapien, die IL-17 hemmen, beweisen gute Wirkung in der Behandlung von Arthritis in Mausmodellen, aber es sind weitere Untersuchungen für die Anwendung an Menschen notwendig. Infliximab ist ein monoklonaler Antikörper gegen TNF- α und wird bei der Behandlung von rheumatoider Arthritis eingesetzt.^{34,4}

2.5.5 Knochenmetastasen und Osteosarkom

Verschiedene Krebsarten wie Darm-, Lungen-, Brust-, Prostata-, Schilddrüsen- und Nierenkrebs metastasieren häufig zu Knochen. Das Osteosarkom ist der häufigste primäre Tumor der Knochen. Sekundäre Metastasen in Knochen treten viel häufiger auf als primäre Tumoren der Knochen. Während der Anfangsphase des Tumors im Knochen werden Wachstumsfaktoren wie TGF- β aus Knochenmatrix freigesetzt. Dann wirkt TGF- β auf bösartige Zellen und stimuliert die Freisetzung der Faktoren wie PTHrP (parathyroid hormone-related protein), IL-6 und IL-11. Diese Tumor-Zytokine stimulieren die Knochenresorption durch Osteoklasten und es werden weitere Wachstumsfaktoren aus dem Knochenmatrix freigesetzt. Laut einer Studie ist TGF- β bei Brustkrebs-Knochenmetastasen sehr wichtig, da er die Produktion von

PTHrP erhöht. PTHrP und IL-11 stimulieren dann auch Osteoblasten um RANKL zu exprimieren. RANKL ist in Tumorzellen hochreguliert und stimuliert die Osteoklastendifferenzierung und –aktivierung.^{4,37}

Wie bereits besprochen, finden Bisphosphonate Anwendung in der Behandlung der Osteoporose. Sie werden auch bei Knochenmetastasen eingesetzt. Durch Stimulierung der Apoptose der Osteoklasten hemmen sie die Osteoklastenfunktion und dadurch die Knochenresorption.⁴

2.6 Melatonin

2.6.1 Allgemeines

Melatonin ist ein ubiquitäres Molekül, das in der Natur weit verbreitet ist. Es kommt in Einzeller, Pflanzen, Pilzen und Tieren vor. Es wird in erster Linie in der Zirbeldrüse synthetisiert und hat einen tageszeitlichen Rhythmus. Melatonin wird auch als das Hormon der Dunkelheit bezeichnet, da es vor allem in der Nacht freigesetzt wird. Es gibt keinen Melatoninspeicher. Das gebildete Melatonin wird gleich in das Blut abgegeben. Es ist ein ausreichend lipophiles Molekül und passiert deshalb außer der Blut-Hirnschranke auch die Plazenta. Melatonin besitzt eine Halbwertszeit von 50 Minuten. Die Metabolisierung findet in verschiedenen Organen statt. In der Leber erfolgt ein Abbau zu 6-Hydroxymelatonin mit anschließender Sulfatisierung. Das sulfatierte 6-Hydroxymelatonin-sulfat wird mit dem Harn ausgeschieden und dient als Parameter für die Melatoninsekretion^{13,14}

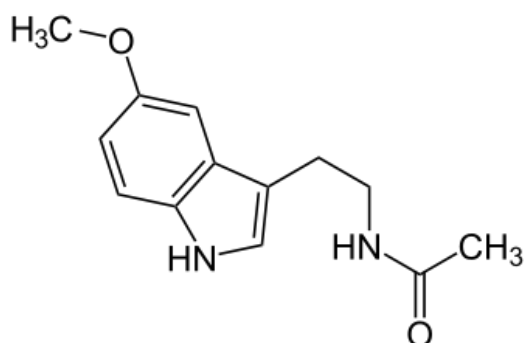


Abb.3: Melatonin (*N*-[2-(5-Methoxyindol-3-yl) ethyl]acetamid)

Das Molekül ist zentral an der Schlafregulierung und an der Regulierung einer Reihe von anderen zyklischen Aktivitäten beteiligt. Die Synthese von Melatonin findet auch in anderen Bereichen des Körpers statt, einschließlich in der Retina, im Gastrointestinaltrakt, in der Haut, im Knochenmark und in den Lymphozyten. Das Hormon nimmt an verschiedenen physiologischen Funktionen des Körpers teil. Es ist ein wichtiges Antioxidans, das freie Radikale abfängt und dadurch die Oxidationsprozesse hemmt. Die zytoprotektiven Eigenschaften von Melatonin werden in der Behandlung der neurodegenerativen Erkrankungen genutzt. Außerdem aktiviert das Hormon das Immunsystem durch Stimulierung der T-Zellen. Melatonin hat einen bedeutenden Stellenwert in der Behandlung verschiedener zirkadianer Störungen, wie zum Beispiel der Schichtarbeiter-Schlafstörung. Die schlaffördernde Eigenschaft von Melatonin wird auch bei der Behandlung der Schlafstörungen bei älteren und depressiven Patienten genutzt.^{13,14}

2.6.2 Biosynthese

Das Vorläufermolekül von Melatonin ist Tryptophan, das aus dem Blut aufgenommen und über 5-Hydroxytryptophan zu Serotonin umgewandelt wird. Serotonin wird dann zu N-Acetylserotonin durch die Arylakylamin-N-Acetyltransferase (AA-NAT) acetyliert. N-Acetylserotonin wird schließlich durch die Hydroxyindole-O-methyltransferase (HOMT) zu Melatonin umgewandelt. Die Melatoninbildung unterliegt einem zirkadianen Rhythmus, der tagsüber durch einen niedrigen Spiegel und in der Nacht durch eine hohe Konzentration charakterisiert wird.¹⁴ Arylakylamin-N-Acetyltransferase (AA-NAT) spielt eine wichtige Rolle in der Melatoninsynthese durch Steuerung der rhythmischen Melatoninproduktion. Ihre Aktivität steigt in der Nacht um das 10-100 fache.³⁸

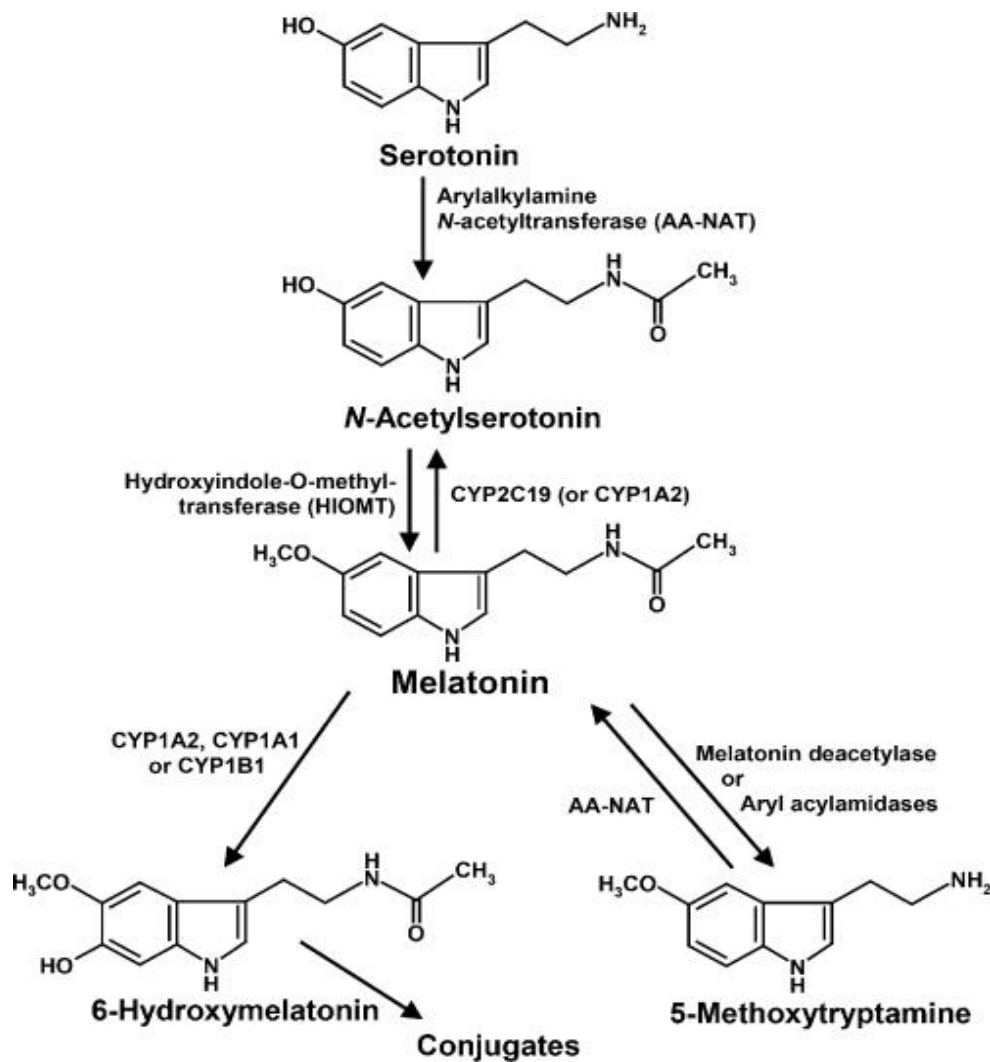


Abb.4: Bildung von Melatonin: Über das Enzym AA-NAT wird Serotonin zu N-Acetylserotonin umgewandelt, das schließlich zu Melatonin methyliert wird.

Die Melatonin-Freisetzung wird im suprachiasmatischen Kern (SCN) reguliert. Das Lichtsignal wird über den Photorezeptoren der Netzhaut gemessen und an den SCN weitergegeben. Schließlich kommt es in der Nacht zur Freisetzung von Norepinephrine, die über β -Rezeptoren die Adenylatcyclase (AC) aktiviert. Daraufhin erhöht sich die cAMP-Konzentration und dies fördert die Synthese von Enzymen, die an der Melatoninbiosynthese beteiligt sind, insbesondere die des Schlüsselenzyms Arylalkylamin- N-Acetyltransferase (AA-NAT).^{14,38}

2.6.3 Metabolismus zu Kynuraminderivaten

Ein großer Anteil an Melatonin wird im Gehirn zu Kynuraminderivaten metabolisiert. Dieser Metabolismus ist besonders interessant, da die antioxidative und entzündungshemmende Eigenschaften von Melatonin weitgehend durch die Metaboliten N¹-Acetyl-N²-Formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) und N¹-Acetyl-5-methoxykynuramine (AMK) vermittelt wird.¹⁴

2.6.4 Melatonin-Rezeptoren

Melatoninfunktionen werden durch die Membran-Rezeptoren MT1 und MT2, die für die chronobiologischen Effekte im suprachiasmaticus Nukleus verantwortlich sind, vermittelt. MT1 und MT2 zählen zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit den charakteristischen sieben Transmembrandomänen.

MT1 und MT2 werden auch in peripheren Organen und Zellen exprimiert und beeinflussen auch immunologische Aktionen. Während MT1 hauptsächlich an der Gefäßkonstriktion, Zellproliferation in Krebszellen, Stoffwechsel- und Reproduktionsfunktionen teilnimmt, verursacht MT2 Vasodilatation, hemmt die Freisetzung von Dopamin in der Netzhaut und verbessert die Immunantwort.³⁹

Neben Membranrezeptoren MT1 und MT2 hat Melatonin auch noch andere Bindungsstellen, wie die nuklearen Rezeptoren der Retinsäure-Rezeptor-Familie ROR α 1, ROR α 2 und RZR β , Chinonreduktase 2, Calmodulin, Calreticulin, und die mitochondriale Bindungsstellen. Während die ROR α 1 und ROR α 2 wahrscheinlich auch an der Immunmodulation beteiligt sind, wird das RZR β im zentralen Nervensystem, einschließlich in der Zirbeldrüse, exprimiert. Chinon-Reduktasen schützen vor oxidativem Stress, indem sie Elektronentransfer-Reaktionen von Chinonen verhindern.

Melatonin senkt über Aktivierung von MT1 und MT2 die cAMP-Konzentration, aktiviert Phospholipase C und Protein-Kinase C, wirkt über die MAP-Kinase und PI3-Kinase. Das Hormon aktiviert Ca²⁺-aktivierte K⁺-Kanäle und spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle.

Obwohl der antioxidative Schutz des Melatonins teilweise auf Rezeptoren-Mechanismen beruht, brauchen einige antioxidative Wirkungen, wie der Elektronen-Austausch mit der mitochondrialen Atmungskette und direktes Abfangen von freien Radikalen, keine Rezeptorenaktivität.^{14,40}

2.6.5 Melatoninwirkungen auf die Knochen

Das in der Zirbeldrüse freigesetzte Melatonin kann die Osteoblastendifferenzierung und Mineralisierung der Matrix fördern. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Knochenwachstums. Außerdem steuert das Hormon verschiedene physiologische und pathophysiologische Prozesse, einschließlich der hypothalamischen Steuerung der zirkadianen Rhythmen, Regelung der Temperatur, der sexuellen Entwicklung und des Immunsystems. Es wird auch zur Behandlung von Schlaflosigkeit und Krebs verwendet und wird auch als Anti-Aging-Mittel auf dem Markt gebracht.⁴¹

Eine Wirkung von Melatonin auf die Knochen wurde festgestellt. In vitro hemmt es die erhöhte Kalziumaufnahme in den Knochen. Eine direkte Aktivität von Melatonin wurde in Prä-Osteoblasten und Osteoblasten-ähnlichen Osteosarkom-Zelllinien nachgewiesen. In der Anwesenheit von nanomolaren Konzentrationen von Melatonin wurde in Prä-Osteoblasten Zelldifferenzierung gehemmt. Nach Melatoninentzug zeigten beide Zelllinien eine erhöhte Genexpression. So wurden die Gene für das Knochenmatrixprotein, Sialoprotein sowie andere Markerproteine, wie alkalische Phosphatase, Osteopontin und Osteocalcin induziert.

In einer anderen Studie, die an menschlichen Knochenzellen und Osteoblasten-Zelllinien durchgeführt wurde, konnte gezeigt werden, dass unter Einfluß von Melatonin die Zellproliferation dosisabhängig erhöht. In diesen Zellen erhöht Melatonin das Prokollagen Typ Ic-Peptid ohne Änderung der alkalischen Phosphatase oder des Osteocalcins. Melatonin scheint die Knochenresorption zu hemmen und die Knochenmasse zu vermehren.

Studien haben gezeigt, dass Melatonin das Skelettwachstum unterstützt und die Knochenmasse durch Hemmung der Knochenresorption erhöht. Western-Blot-

Analyse zeigte nach Melatoninbehandlung eine verminderte Expression von RANKL und Kollagen I. Aufgrund der reduzierten Expression von RANKL wurde die Anzahl der Tartrat-resistenten saure Phosphatase (TRAP)-positiven Osteoklasten gesenkt. Da Knochenresorption eine wichtige Voraussetzung für Frakturheilung ist, kann man daraus schließen, dass Melatonin die Frakturheilung durch Hemmung der Knochenresorption beeinträchtigt.⁴²

Melatonin induziert dosisabhängig Proteine, die in die Knochenmatrix eingebettet sind, wie Prokollagen Typ I C Peptid. Ein anderes Protein, Osteoprotegerin, das die Differenzierung der Osteoklasten hemmt, wird auch durch den Einfluß von Melatonin vermehrt. Eine andere Zielzelle für Melatonin sind die Osteoklasten, die Knochen teilweise durch freie Radikale abbauen, und dies kann den abbauenden Prozess beschleunigen. Aufgrund der antioxidativen Eigenschaft kann das Hormon freie Radikale abfangen und so die Aktivität der Osteoklasten hemmen. Spätere Studien haben die präventive Wirkung von Melatonin auf den Knochenverlust bestätigt.^{14,43}

In nachfolgenden Studien wurde dargestellt, dass Melatonin sowohl hemmende Effekte auf Osteoklasten als auch auf Osteoblasten hat. Außerdem hemmt Melatonin die Fortschreitung der Osteopenie, die eine Vorstufe von Osteoporose ist. Als eine neue Therapiemöglichkeit für Knochenkrankheiten zur Erhöhung der Knochenmasse muss Melatonin aber noch weiter untersucht werden und mögliche Nebenwirkungen müssen bestimmt werden.⁴³

3 Material und Methoden

3.1 Gewinnung von Zellen aus Mausknochenmark

Alle Experimente wurden in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe für Osteoimmunologie (Leitung Prof. Peter Pietschmann) am Institut für Pathophysiologie und Allergieforschung durchgeführt und wurden von der Tierethikkommission der Medizinischen Universität Wien genehmigt.

Reagentien:

- Ethanol 70 %
- MEM- α medium without nucleosides (Gibco, 22561), plus:
 - 10 % FCS-Gold (PAA, A15-151, Lot: A15110-1333), heat inactivated
 - 1 % PenStrep (Penicillin-Streptomycin, Gibco, 15140-122)
 - 0.1 % Fungizone (Amphotericin B, Gibco, 15290-026)
- m RANKL (Peprotech, 315-11; Lot: 0509233), dil. to 10 ng / μ l with PBS + 0.1 % BSA
- m M-CSF (R&D-Systems, 416-ML; Lot: ME1710051), dil. to 10 ng / μ l with PBS + 0.1 % BSA
- Melatonin (Calbiochem, 444300)
- DMSO (sterile; Sigma, D2650)
- Piceatannol (Sigma, P0453)
- 10ml isotone Lösung

Material:

- Pinzette
- Schere
- Nabelschnurklemme
- Maus
- Styroporplatte
- Petrischale
- Zentrifugenröhrchen 50ml (Fa. TIPP)
- Spritze (NormJect®, 10 ml)
- Spritzennadel (FineJect®, 0,4mm)
- 24 Loch-Testplatten (Fa. TIPP)

- 48 Loch-Testplatten (Fa. TIPP)
- Rund Deckgläser (12 mm Durchmesser, 7mm Durchmesser, Fa. Thermo Scientific, Waltham – USA)

Geräte:

- CO₂-Kammer
- Lamina Air Flow
- Coulter Counter
- Wasserbad 37°C

3.1.1 Präparation der Knochen

Die Maus wird mit Hilfe einer CO₂-Beatmung narkotisiert und gleich darauf durch eine zervikale Dislokation getötet. Anschließend wird die getötete Maus mit Nadeln auf eine Stryporplatte fixiert. Das Fell der Maus wird mit Alkohol abgespült, um eine Kontamination zu vermeiden. Jetzt wird mit dem Herauspräparieren der Tibia und des Femurs begonnen. Im ersten Schritt wird das Fell der Hinterbeine entfernt. Danach werden Muskeln und Gewebe von den Knochen abgetrennt. Nach dem Abtrennen der Knochen vom Oberschenkel werden Tibia und Femur am Kniegelenk voneinander getrennt.

Die Gewinnung der Zellen aus dem Knochenmark werden unter dem Lamina Air Flow durchgeführt, weil man steril arbeiten soll. Vor dem Arbeiten muss der Arbeitsplatz vorbereitet sein. Der Lamina Air Flow muss 20 Minuten vor der Verwendung mit UV-Licht eingeschaltet sein um möglichst steril zu arbeiten. Danach wird der Arbeitsplatz mit 70%igem Alkohol gründlich abgewaschen und die benötigten Materialien bereitgehalten. Es ist zu beachten, dass man beim Arbeiten mit Zellkultur immer Handschuhe trägt. Diese sollen ebenfalls vor dem Arbeiten mit Alkohol abgespült werden.

Im nächsten Schritt saugt man 10ml Medium in eine Spritze auf. Dann werden Tibia und Femur an ihren Enden aufgeschnitten und so der Knochenmarkskanal freigelegt. Die vier Knochen werden mit einer dünnen Nadel mit jeweils 2,5 ml Medium

durchgespült. Diese Zellsuspension wird in einem 50ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen.

3.2 Kultivierung der Osteoklasten

3.2.1 Sterilisation der Deckgläser

Materialien:

- Deckgläser rund, 12 mm (Carl Roth)
- Alufolie
- Sterilindikatorband

Reagentien:

- Aceton
- Alkohol 96 %

Geräte:

- Brutschrank
- Heizplatte

Die Deckgläser werden in einem Becherglas gesammelt. Danach werden sie zur Reinigung mit Aceton bedeckt und dann wird gewartet, bis das Aceton unter Anwendung einer Wärmeplatte langsam verdunstet. Dann wird in das Becherglas mit 96%igem Alkohol gefüllt, der ebenfalls auf der Heizplatte abgedampft wird. Das Becherglas wird mit Alufolie verschlossen und mit einem Sterilindikatorband versehen. Die Deckgläser werden 2 bis 4 Stunden lang bei 150°C im Brutschrank sterilisiert.

3.2.2 Zellzählung am Zellzählgerät (Coulter Counter)

Gerät

- Coulter Counter (Beckmann)

Materialien und Reagentien

- Zellsuspension
- Reinigungsmittel
- Coulter Counter Röhrchen
- Isotone Pufferlösung

Pinzip:

Coulter Counter ist das Gerät für Zellzahlbestimmung und Größenanalyse. Zuerst wird die Zellsuspension durch die Zugabe einer isotonen Kochsalzlösung verdünnt. Das Zellzählgerät besteht aus zwei Kapillaren, wobei eine in die Probe eintaucht und die andere außerhalb bleibt. Die innere Kapillare besitzt eine kleine Öffnung, durch die die Zellen in der Elektrolytlösung angesaugt werden. Durch Passieren der Zelle kommt es zu einer Änderung des elektrischen Widerstands, der gemessen wird.

Durchführung

Die erhaltene Zellsuspension wird zur Bestimmung der Zellzahl in den Coulter Counter gebracht. Für eine erfolgreiche Züchtung der Osteoklasten in der Kultur soll jedes Well in der Testplatte ungefähr 1,5 Millionen Zellen enthalten.

In das Coulter Counter Röhrchen, das 10 ml isotoner Kochsalzlösung enthält, pipetiert man 100 µl der Zellsuspension. Das Gerät führt drei Messungen durch und gibt den Mittelwert an. Das Ergebnis entspricht der Zellzahl pro ml.

Damit die Schläuche nicht verstopfen wird zum Schluss das Gerät mit einer Reinigungslösung, die aus einer isotonen Pufferlösung und Reinigungsmittel besteht, durchspült. Zusätzlich wird die Reinigungslösung ständig im Gerät gelassen, um eine Austrocknung der Elektroden zu vermeiden.

3.2.3 Vorbereiten des Nährmediums

Geräte:

- Wasserbad 37°C
- Lamina Air Flow

Reagentien:

- MEM- α medium without Nucleosides (Gibco, 22561), plus:
 - 10 % FCS-Gold (PAA, A15-151, Lot: A15109-1236)
 - 1 % PenStrep (Penicillin-Streptomycin, Gibco, 15140-122)
 - 0.1 % Fungizone (Amphotericin B, Gibco, 15290-026)
- RANKL (Peprotech, 315-11; Lot: 0509233)
- M-CSF (R&D-Systems, 416-ML; Lot: ME1710051)
- Melatonin (Calbiochem, 444300)
- DMSO (sterile; Sigma, D2650)
- Piceatannol (Sigma, P0453)

Im Lamina Air Flow setzt man dem Nährmedium 10 % fetales Kälberserum (50 ml), 1 % Penicillin-Streptomycin (5 ml) und 0,1 % Fungizone (500 μ l) zu. Vor dem Arbeiten mit dem Nährmedium soll man es im Wasserbad bei 37° C erwärmen. Später fügt man dem α -MEM die Wachstumsfaktoren RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand) und M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) zu. RANKL und M-CSF wurde in einer Konzentration von 25 ng/ml (RANKL) und 15 ng/ml (M-CSF) zugefügt. Außerdem werden noch andere Substanzen wie Melatonin, DMSO und Piceatannol in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt, um die Osteoklastenwachstum zu beeinflussen.

Durchführung:

Geräte:

- Brutschrank
- Lamina Air Flow

Materialien und Reagentien:

- Kulturplatten:
 - 24-Testplatte
 - 48-Testplatte
- Nährmedium
- Pipetten
- Deckgläser
- Zellsuspension

Um Kontamination mit Keimen zu vermeiden, werden die Arbeitsschritte in der Sterilwerkbank (Lamina Air Flow) durchgeführt. Zunächst wird die gezählte Zellsuspension auf die gewünschte Zellzahl pro Well verdünnt. Die Deckgläser werden in die 24-Platte gelegt. Anschließend wird die Verdünnungsreihe mit den Zusätzen hergestellt. Dann folgt die Pipettierung in eine 24well-Platte, wobei jedes Well 1 ml Zellsuspension bekommt. Die fertig pipettierte Platte wird in den Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ zur weiteren Inkubierung gebracht. Die Inkubationszeit beträgt 7 Tage, wobei der Mediumwechsel alle 2 Tage stattfinden soll.

Tab. 1: Das Pipettierschema

	medium			addition 1			addition 2		
Pos	30,00	ml	Cell suspension	75,0	µl	RANKL	45,0	µl	M-CSF
Mel 1 µM	4,13	ml	Pos	4,1	µl	Mel stock			
Mel 100 nM	3,69	ml	Pos	410,4	µl	Mel 1µM			
Mel 10 nM	3,15	ml	Pos	350,0	µl	Mel 100 nM			
DMSO 10	2,51	ml	Pos	2,5	µl	DMSO			
DMSO 100	2,47	ml	Pos	274,9	µl	DMSO 10			
DMSO 1k	2,20	ml	Pos	244,4	µl	DMSO 100			
Pic 20 µM	2,51	ml	Pos	2,5	µl	Pic stock			
Pic 2 µM	2,47	ml	Pos	274,9	µl	Pic 20 µM			
Pic 0.2 µM	2,20	ml	Pos	244,4	µl	Pic 2 µM			

Tab. 2: Das verwendete Platten-Layout

	1	2	3	4	5	6
A	Pos	Mel 1 µM	Mel 100 nM	Mel 10 nM	Pic 20	Pic 20
B	Pos	Mel 1 µM	Mel 100 nM	Mel 10 nM	Pic 2	Pic 2
C	Pos	Mel 1 µM	Mel 100 nM	Mel 10 nM	Pic 0,2	Pic 0,2
D	DMSO 10	DMSO 10	DMSO 100	DMSO 100	DMSO 1k	DMSO 1k

Pos: medium + RANKL/M-CSF; Pic 2: Pos + Pic 20; Mel 1µM: Pos + melatonin Stammlösung 1µM; Pic 0,2: Pos + Pic 2; Mel 100nM: Pos + melatonin 100nM; DMSO 10: Pos + DMSO Stammlösung; Mel 10nM: Pos + melatonin 10nM; DMSO 100: Pos + DMSO 10; Pic 20: Piceatannol; DMSO 1k: Pos + DMSO 100

3.3 Immunfluoreszenzfärbung

3.3.1 Prinzip

Immunfluoreszenzfärbung, die auch als Antikörperfärbung genannt wird, ist eine spezielle Methode, bei der Proteine (Antigene) mit Hilfe von Antikörpern markiert und sichtbar gemacht werden. Damit kann man das Vorhandensein und Lokalisation von Proteinen in den Zellen bestimmen. Das Prinzip einer Immunfluoreszenzfärbung beruht auf einer Antikörper-Antigen-Reaktion. Antikörper werden vom Immunsystem als Antwort auf fremde Proteine (Antigen) produziert und weisen eine hohe Affinität und Spezifität zu einem bestimmten Bindungsbereich (Epitop) der Antigene auf. Es wird zwischen direkter und indirekter Methode unterschieden.

Direkte Methode: Der Antikörper, der mit einem Fluorophor oder Enzym gekoppelt wird, wird mit dem Antigen in Verbindung gebracht. Nicht gebundene Antikörper werden im weiteren Schritt ausgewaschen. Mit dem Enzym markierte Antikörper reagieren dann mit Substraten, die einen Farbstoff bilden. Fluorochrom-markierte Antikörper werden im Fluoreszenzmikroskop detektiert.

Indirekte Methode: Der spezifische Antikörper, der unmarkiert ist, wird auf die Probe aufgebracht. Die Färbung erfolgt im nächsten Schritt. Ein zweiter Antikörper (Sekundärantikörper), der markiert ist, richtet sich spezifisch gegen den ersten Antikörper.

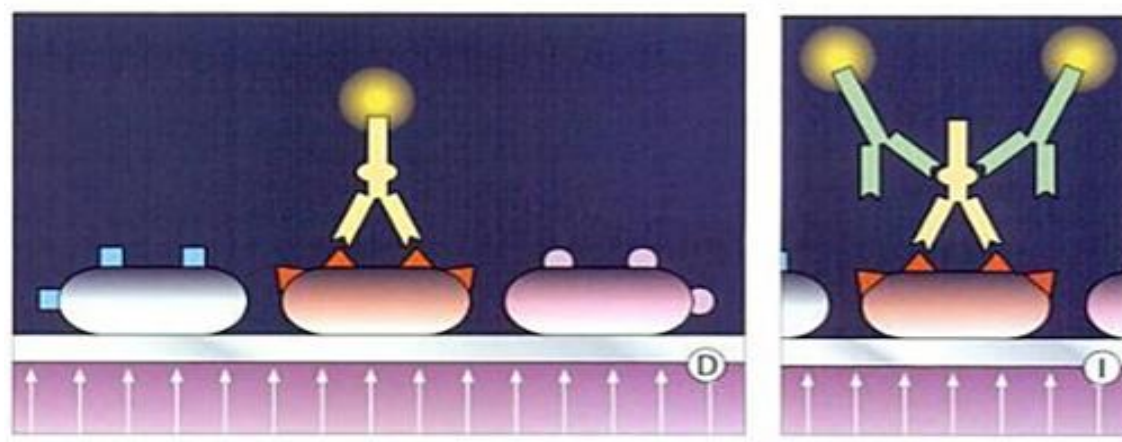


Abb.5: direkte Methode

indirekte Methode⁴⁴

3.3.2 Vorbereitung

➤ Sterile gepufferte Salzlösung (PBS)

8,01 g NaCl, 1,44 g Na₂HPO₄·2H₂O, 0,20 g KCl, 0,21 g KH₂PO₄ werden in 800 ml Aqua bidest. zu einer klaren Lösung gelöst. Der pH-Wert wird entweder mit einer Base (0,1N NaOH) oder einer Säure (HCl) auf 7,4 eingestellt. Dann wird die Lösung mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt und die Osmolarität gemessen. Später wird sie in Glasflaschen aufgeteilt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wird die Lösung bei 4°C gelagert.

➤ 50mM Ammoniumchlorid (NH₄Cl) in PBS

In 250 ml PBS gibt man 668,5 mg NH₄Cl. Es wird so lange gerührt bis eine klare Lösung entsteht. Dann wird die Lösung in Glasflaschen gefüllt und autoklaviert. Es wird bei 4°C gelagert.

➤ 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS

20 g PFA wird in 500 ml PBS unter Erwärmen und Rühren gelöst. Da PFA ein schlecht lösliches Pulver ist, wird bis 65°C erwärmt, um eine klare Lösung zu erhalten. Wenn man keine klare Lösung erhält, kann man NaOH zusetzen. Die Lösung wird abgekühlt und filtriert. Es wird unter dem Abzug gearbeitet. Die Mischung wird bei -20°C gelagert.

➤ 10 % Bovine Serum Albumin (BSA) in PBS

Man löst 5 g BSA in 50 ml PBS und stellt so eine 10 %ige Stammlösung her. Es wird eine größere Menge hergestellt um mehrere Färbungen durchzuführen. Die Lösung wird aliquotiert und bei -20° C gelagert.

3.3.3 Durchführung

Geräte:

- Schüttler
- Vortexer
- Minizentrifuge

Reagenzien und Materialien:

- 4 % PFA in PBS
- PBS
- Aqua bidest.
- Triton X-114 (Fa. Sigma-Aldrich)
- 10 % BSA in PBS
- 50 mM NH₄Cl in PBS
- DAPI (Fa. Roche, Schweiz)
- Fluoromount G (Southern Biotech)
- Objektträger (Thermo Scientific)

Antikörper

Für die Färbung der Plasmamembran wird ein Antikörper gegen den Calcitonin-Rezeptor, für das Cytoskelett ein Antikörper gegen α -Tubulin verwendet. Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI) sichtbar gemacht. Die Osteoklastenvorläuferzellen werden mit einem Antikörper gegen F4/80 Makrophagen-Marker gefärbt.

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

Tabelle 3: Liste der Antikörper

	Antikörper	Verdünnung
Primäre Antikörper	Goat anti MT1 (4 °C, Santa Cruz, sc-13186)	1:500
	Rat anti F4/80 macrophage marker (4 °C, eBioscience.com, 14-4801)	1:1000
	Rabbit anti calcitonin receptor (4 °C, Acris SP4717P)	1:1000
	Mouse anti α -Tubulin (-20 °C, SigmaAldrich, T5165)	1:1000
Sekundäre Antikörper	Donkey anti goat Alexa Fluor 647 (Invitrogen molecular probes, A-21447)	1:1000
	Goat anti rat IgG Alexa Fluor 568 (Invitrogen molecular probes, A11077)	1:1000
	Goat anti rabbit IgG Alexa Fluor 750 (Invitrogen molecular probes, A21039)	1:1000
	Goat anti mouse IgG Alexa Fluor 750 (Invitrogen molecular probes, A21235)	1:1000

1. Fixierung der Zellen

Im ersten Schritt erfolgt die Fixierung der Zellen. Zuerst wird das Nährmedium in der Testplatte abgesaugt. Dann wird jedes Well zweimal mit PBS für jeweils 5 Minuten gewaschen. PBS wird danach wieder entfernt und die Testplatte mit 1 ml 4 %ige Lösung von PFA in PBS versetzt. Nach 15 Minuten wird nochmals mit PBS gewaschen. Später werden die Zellen mit 50 mM NH₄Cl für 10 Minuten inkubiert, um die freien Aldehydgruppen des PFA abzublockieren.

2. Permeabilisieren und Blockieren

Jetzt wird die Osteoklastenmembran permeabilisiert, um den Zugang der Antikörper zu schaffen. Zuerst verdünnt man eine 10 %ige Lösung von BSA in PBS mit 0,5 % Triton X. Triton X ist ein nichtionisches Detergenz, das die Membranproteine löst. Die hergestellte Lösung wird in jedes Well pipettiert und für 60 Minuten inkubiert.

3. Inkubation mit den primären Antikörper

Zuerst werden die Antikörper in 0,5 % Triton X 100 + 1 % BSA in PBS verdünnt. Dann wird in jedes Well 1 ml Antikörperlösung zugegeben und eine Stunde lang inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen 4x mit PBS für 10 Minuten gewaschen.

4. Inkubation der sekundären Antikörper

Ab diesem Arbeitsschritt muss man im Dunkeln arbeiten, da die sekundären Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind und daher lichtempfindlich. Die Antikörper werden verdünnt. Nach dem Pipettieren wird die Testplatte mit Alufolie abgedeckt, um vor Licht zu schützen. Nach 30 Minuten Inkubationszeit werden die Zellen mit PBS zweimal für 10 Minuten gewaschen.

5. Färbung der Zellkerne mit DAPI

Die Zellkerne werden mit 4',6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI) gefärbt. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff und interkaliert mit der DNA. Der Farbstoff wird mit Aqua bidest. 1:1000 verdünnt und 15 Minuten inkubiert. Später folgen zwei Waschschrte mit Aqua bidest. für 5 Minuten.

6. Fixierung der Deckgläser auf den Objektträger

Auf den Objektträger wird ein Tropfen Fluoromount G aufgetragen. Mit Hilfe einer dünnen Nadel werden die Deckgläser seitlich angehoben und langsam mit einer Pinzette genommen. Die Deckgläser werden zunächst auf einem Tuch vorsichtig abgetupft. Später legt man die Deckgläser mit den Zellen nach unten auf den Objektträger. Pro Objektträger fixiert man 4 Deckgläser. Die fertigen Objektträger werden über Nacht stehen gelassen.

3.4 TRAP (Tartrat-resistente saure Phosphatase) - Färbung

3.4.1 Prinzip

Es kann zusätzlich auch eine TRAP (Tartrat-resistente saure Phosphatase) – Färbung durchgeführt werden. TRAP ist ein Enzym, das von vielkernigen Osteoklasten gebildet wird. Daher ist es sinnvoll die TRAP – Färbung zu machen, um herauszustellen, ob sich in einer Kultur ausreichend Osteoklasten sich gebildet haben. Diese Färbung ist eine einfache und schnelle Methode. Die mehrkernigen Osteoklasten werden violett gefärbt und sind im Durchlichtmikroskop von den anderen Zellen leicht zu differenzieren.

Verwendete Geräte:

- Schwenker
- Wasserstrahlpumpe

Verwendete Reagenzien und Materialien

- Citratpuffer pH 3,6: 0,4g Zitronensäure
 0,265g Natriumcitrat
 0,07g Natriumchlorid
 100ml destilliertes Wasser
- Fixierlösung 25ml Citratpuffer

8ml Formaldehyd 37%

65ml Azeton

➤ Färbelösung a) 9 ml aqua bidest.

400 µl Acetat

200 µl Tartrat

100 µl Naphtol

b) 100 µl Nitritlösung

100 µl o-Aminoazotoluen

Zuerst wird das Medium von der Platte abgesaugt und die Zellen werden mit der Fixierlösung 10 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach dem Fixierungsschritt werden die Zellen zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Dann wird die Färbelösung hergestellt, indem man die Reagenz A und Reagenz B zusammenmischt. Nach dem Auftragen mit der Färbelösung werden die Zellen 20 Minuten inkubiert. Danach werden sie nochmals mit destilliertem Wasser gewaschen. Die violett gefärbten Osteoklasten können unter Mikroskop bestimmt werden.

3.5 Kultivierung der RAW 264.7 Zellen

Auftauen der Zellen

Die Zellen, die im flüssigen Stickstoff bei -180 °C gelagert werden, genommen und in der Hand aufgetaut. Nach dem Auftauen werden die Zellen mit ca. 5 ml Medium, das ebenfalls aufgewärmt wird (37 °C), gewaschen. Dann werden sie abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Das verbliebene Pellet wird mit 10 ml Medium gelöst und in eine T-75 Flasche gegeben. Es ist wichtig, dass die Zellen homogen verteilt sind, daher wird es unter dem Mikroskop kontrolliert.

Passagierung der Zellen

Die Zellen werden alle 2 – 3 Tage 1:3 gesplittet. Dafür wird das alte Medium entfernt und das frische Medium pipettiert. Dann werden die Zellen mit einem Zellschaber vorsichtig abgekratzt und mit einer Pipette durch öfters auf- und abziehen gut homogenisiert. Die Waschschrte mit PBS wurden weggelassen, da kein Trypsin verwendet wurde.

Einfrieren der Zellen

Es ist wichtig am Vortag das Medium zu wechseln. Die Zellen sollten sich bei einer Konfluenz von 70 – 80 % befinden. Sie müssen noch in der Wachstumsphase sein, weil es lange dauert bis die Zellen sich wieder teilen. Die Suspension mit den abgekratzten Zellen wird in ein 15 ml Falconröhrchen gegeben. Danach werden sie gezählt und abzentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Pellet in 3 ml kaltem Einfriermedium gelöst. Von diesem wird jeweils 1 ml in ein 1,5 Cryovial gegeben, in Eis gestellt und für einige Stunden auf -70 °C gegeben. Mit diesem Vorgang wird versucht, dass sie sich langsam abkühlen. So wird ebenfalls die Kristallbildung verhindert. Später werden die Zellen in kalten flüssigen Stickstoff (-180 °C) gegeben.

Medien

Kultivierung:

DMEM + 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin-Streptomycin

Einfrieren:

DMEM + 20 % FCS, 10 % DMSO und 100 U/ml Penicillin-Streptomycin

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Optimierung der Osteoklastenkultur

Ein Ziel dieser Diplomarbeit war es, vielkernige Osteoklasten –ähnliche RAW 264.7 Zellen und murine Osteoklasten zu züchten und diese mithilfe des automatischen Auswertesystem zu identifizieren. Dadurch können die Wirkungen der Arzneistoffe und Hormone auf Osteoklasten untersucht werden.

Die Zellen wurden sieben Tage lang auf Glas Coverslips bei 37°C -unter normalen Gewebekulturbedingungen (5% CO₂) inkubiert und alle zwei Tage wurde das Medium und die Medienzusätze gewechselt.

Bei den durchgeführten Experimenten wurden Knochenmarkszellen aus weiblichen und männlichen Mäusen zur Gewinnung der Osteoklasten verwendet. Damit konnte man feststellen, ob das Geschlecht einen Einfluss auf das Osteoklastenwachstum hat. Die Versuche mit den RAW 264.7 Zellen zeigten, dass aus diesen Zellen viele Riesenosteoklasten gezüchtet werden können.

4.2 Automatische Quantifizierung mehrkerniger Osteoklasten

Die knochenabbauenden Osteoklasten sind an verschiedenen Krankheiten wie Morbus Paget, Rheumatoide Arthritis, Osteoporose, Riesenzelltumore und Knochenmetastasen beteiligt. Ein wichtiger Grund für die Entstehung dieser Krankheiten ist die Überaktivität der Osteoklasten.

Wie bereits beschrieben, sind reife Osteoklasten vielkernig und exprimieren den Calcitoninrezeptor. Sie können aber keinen Makrophagenmarker, den F4/80 Rezeptor, exprimieren und können dadurch von den Vorläuferzellen unterschieden werden. Außerdem exprimieren die Osteoklasten das Enzym TRAP, das durch eine chemische Reaktion nachgewiesen wird. Diese Färbung ist eine einfache Methode, um Osteoklasten zu erkennen und zu quantifizieren. Sie werden dann manuell gezählt. Da die TRAP – Auszählung extrem varibale Ergebnisse liefert, hat man

versucht, eine Software zu entwickeln, die die Osteoklasten in Kultur nach der Aufnahme im Mikroskop automatisch identifiziert und quantifiziert.

Wenn eine Kultur genügend TRAP Aktivität und damit viel Osteoklasten aufweist, wird sie für die Evaluierung des neuen automatischen Auswertesystems im Tissue Fax herangezogen. Vorher werden die Zellen aber mittels Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht. Dabei muss für die automatische Identifizierung mehrkerniger Osteoklasten ein Marker, der nur von reifen Osteoklasten, nicht aber anderen Zellen in der Kultur exprimiert wird, gesucht werden. Dies trifft weitgehend für den Calcitoninrezeptor zu.

In den durchgeführten Experimenten wurde ein Antikörper gegen den Calcitoninrezeptor zur Bestimmung der Osteoklastenoberfläche eingesetzt. Ein anderer Antikörper gegen α -Tubulin lässt das Zytoskelett sichtbar werden und zeigt daher ob die Zellkerne zu einer bestimmten Zelle gehören. Der Antikörper gegen F4/80 Makrophagen wird zur Unterscheidung von reifen Osteoklasten und Vorläuferzellen verwendet. Alle Zellkerne werden mit dem Farbstoff 4,6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) gefärbt, der bei UV-Licht blau fluoresziert.

Nach der Immunfluoreszenz – Färbung erfolgt die Fluoreszenzmikroskopie an einem automatisierten Mikroskop, dem TissueFAXS. Die Bildanalysesoftware, die in Zusammenarbeit der Firmen TissueGnostics und Seewald Solutions und dem Institut für Pathophysiologie und Allergieforschung (Dipl. Ing. Andreas Heindl, Arbeitsgruppe Prof. Isabella Ellinger) entwickelt worden war, analysiert die Bilder automatisch und erkennt verschiedene Parameter. Es wird die Zahl der Osteoklasten, die Zahl der Zellen, die nicht als Osteoklasten erkannt werden, die Größe der Zellen, das Verhältnis zwischen Osteoklasten und nicht Osteoklasten und die Anzahl der Zellkerne bestimmt.

Abbildung 6 zeigt eine automatische Identifizierung von Osteoklasten mit der Bildanalysesoftware. Nach der Aufnahme der gefärbten Zellen mittels TissueFaxs erkennt die neue Software die Osteoklasten.

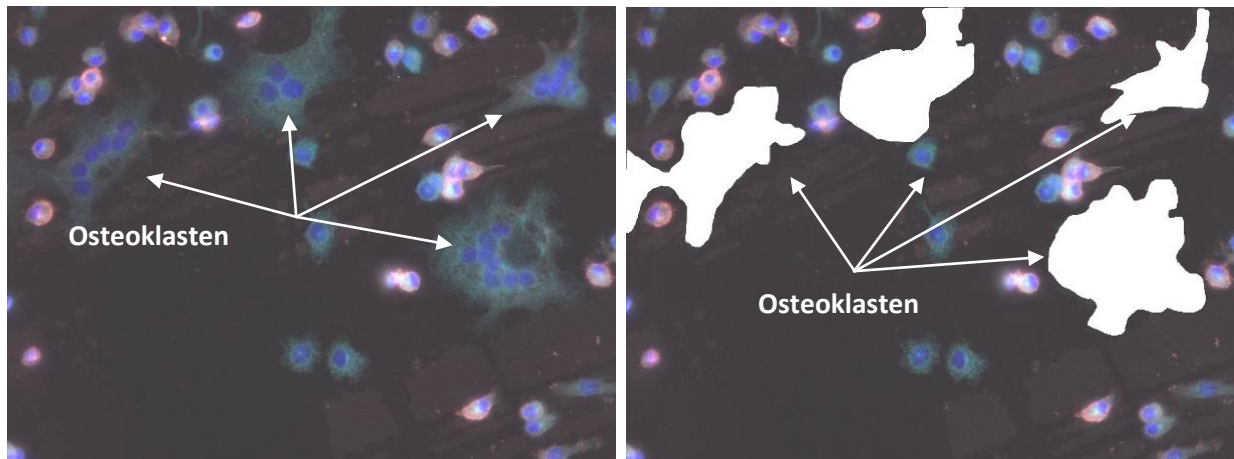


Abb.6: Automatische Identifizierung von Osteoklasten mit der Software: Links ist die Aufnahme der gefärbten Zellen mit TissueFaxs. Rechts hat die neu geschaffene Software die Osteoklasten erkannt und sind weiß dargestellt.

4.3 Wirkung von Melatonin auf das Osteoklastenwachstum

In dieser Diplomarbeit wurde der Einfluß von Melatonin auf das Wachstum von Osteoklasten analysiert. Die Zellkultur wurde sieben Tage lang mit Konzentrationen von 10 nM, 100 nM und 1 µM Melatonin kultiviert. Die Kontrollgruppe wurde nur mit 25 ng/ml RANKL und 15 ng/ml M-CSF behandelt. Die Abbildung 7 zeigt die Wirkung von Melatonin mit unterschiedlichen Konzentrationen auf die Differenzierung der Osteoklasten. Bei einer Konzentration von 1 µM Melatonin wurde eine Bildung von Zellnetzwerken entdeckt. Bei Zellnetzwerken kann keine automatische Auswertung durchgeführt werden. Bei 100 nM sank die Bildung der Osteoklasten signifikant als bei der Kontrollgruppe. Bei einer Konzentration von 10 nM waren es weniger Osteoklasten als bei 100 n

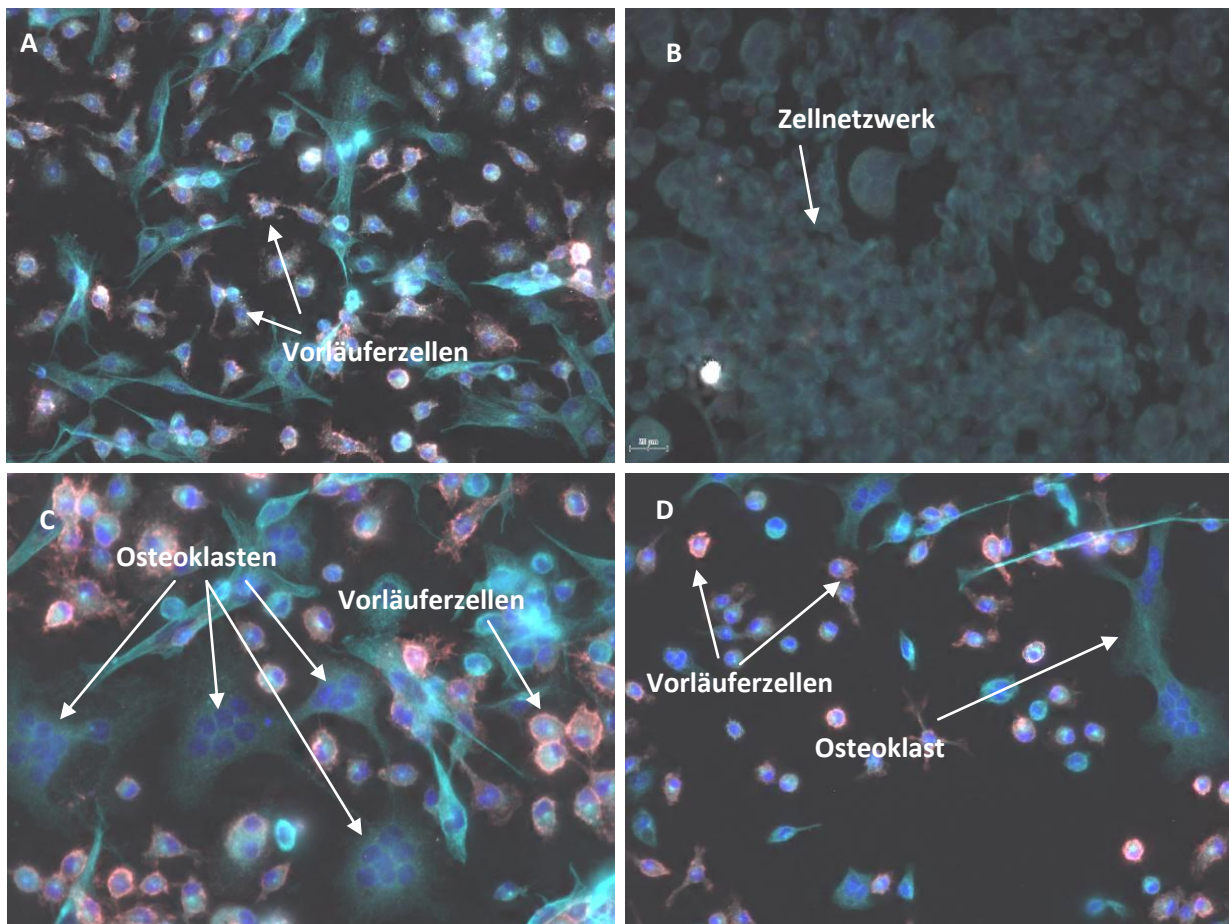


Abb.7: Wirkung von Melatonin auf das Osteoklastenwachstum: A) Zellen ohne Melatonin; B) Zellen mit 1 μ M Melatonin. Es bildet sich ein Zellnetzwerk. C) In Gegenwart von 100 nM Melatonin sank die Zahl der Osteoklastenbildung ab D) Bei Zugabe von 10 nM Melatonin war das Osteoklastenwachstum geringer als bei 100 nM Melatonin.

4.4 Differenzierung der RAW 264.7 Zelllinie

Um das Programm für die Osteoklastenerkennung zu evaluieren, wird außer den murinen Knochenmarkszellen auch eine osteoklastenähnliche, mehrkernige Zelllinie, die RAW 264.7 Zellen, verwendet. RAW 264.7 Zellen sind murine, monozytäre und leukämische Makrophagen mit ähnlichen Eigenschaften, wie sie auch die Osteoklasten besitzen. Um das Imageanalyseprogramm für mehrkernige Zellen zu testen, wurden Versuche mit RAW 264.7 Zelllinie gemacht.

Die frisch in die Kultur gebrachten einkernigen Zellen wurden mit RANKL und M-CSF in α -MEM inkubiert. Die vorherigen Studien haben gezeigt, dass in diesem Medium viel größere Osteoklasten entstehen als in einem anderen Medium, z.B. in DMEM.

Dann wurde wie bei den Osteoklasten beschrieben, eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt.

Bei der Aufnahme der gefärbten Zellen konnte man sehen, dass der F4/80 Antikörper die Vorläuferzellen nicht rot färbte, da kultivierte Zellen dieser Zelllinie den F4/80 Rezeptor nicht exprimieren. Es konnten aber der Calcitoninrezeptor und das α -Tubulin nachgewiesen werden.

4.4.1. Riesenosteoklasten bei RAW 264.7 Zellen

Bei der RAW 264.7 Zelllinie konnte man durch die Behandlung mit 25 ng/ml RANKL und 15 ng/ml M-CSF sehr gute Ergebnisse bekommen und es entwickelten sich zahlreiche Riesenosteoklasten bzw. multinukleäre Makrophagen.

In der Abbildung 8 sieht man, dass die Zellkerne bei größeren Zellen vor allem am Rand der Zelle lokalisiert sind. Bei kleineren Zellen sind die Zellkerne über die ganze Zelle verteilt.

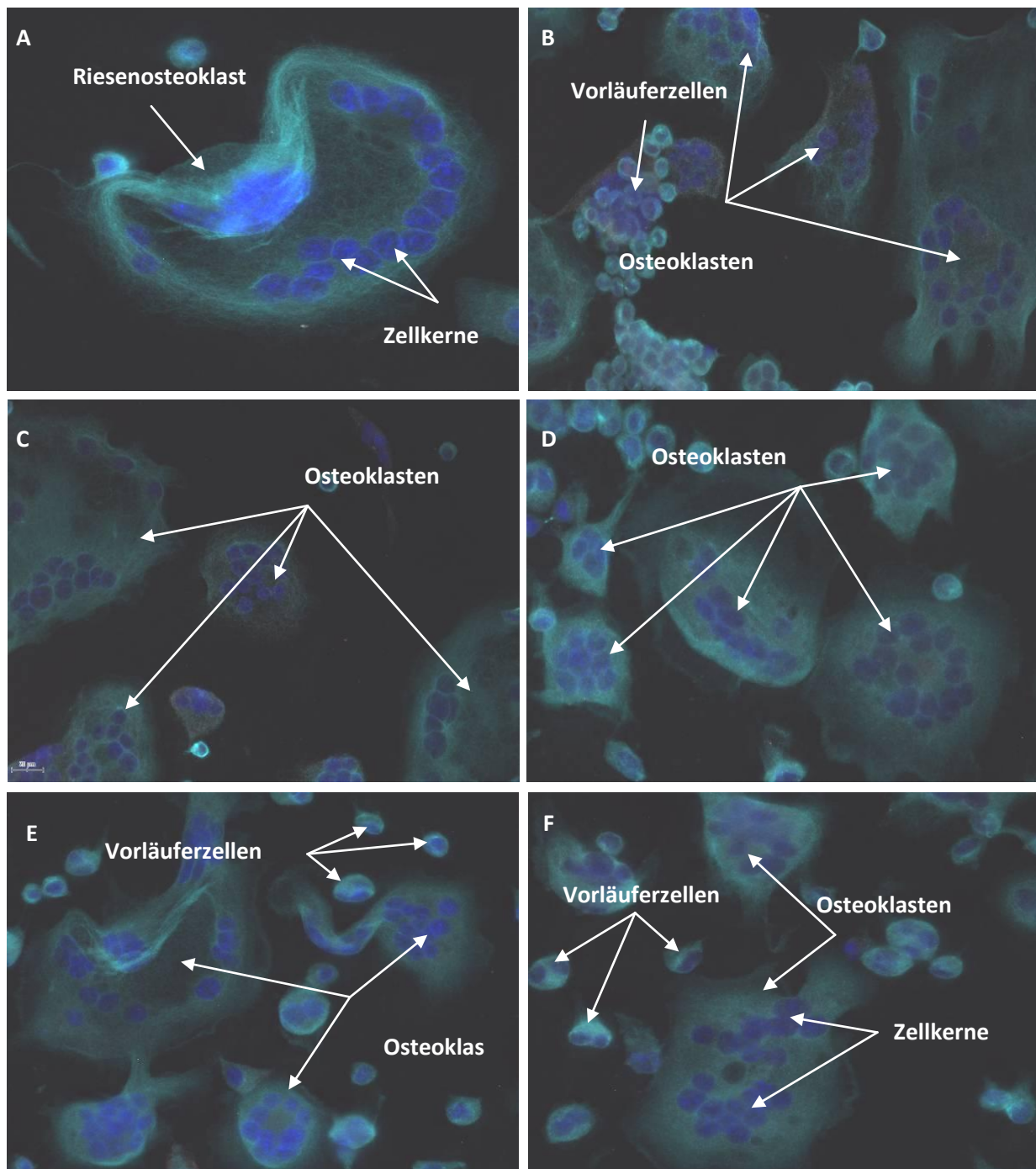


Abb.8: Riesenosteoklasten bzw. Multinukleäre Makrophagen in RAW 264.7 Zelllinie: Die primären Antikörper gegen den Calcitoninrezeptor (grün) und α -Tubulin (grün) sind sichtbar, dagegen ist der F4/80 Antikörper gegen das Makrophagenantigen nicht zu erkennen. Dies lässt den Schluss zu, dass diese vielkernigen Zellen eher Osteoklastenähnliche sind, obwohl ein Knochenresorptionsassay nicht durchgeführt worden war. Die Bilder A-F zeigen kleine und große vielkernige Osteoklasten. Bei den größeren Osteoklasten befinden sich die Zellkerne eher am Rand der Zelle. Dahingegen sind die Zellkerne bei den kleinen Osteoklasten über die gesamte Zelle verteilt.

4.5 Variabilität in der Kultivierung von Osteoklasten

Bei der Kultivierung der murinen Knochenmarkszellen zeigte es sich, dass die Osteoklastenbildung extrem variabel ist. Bei einem Experiment wurden viele Osteoklasten gebildet, während in der nächsten Versuchsreihe keine Osteoklasten gebildet wurden.

Es kommt auch vor, dass die Zellen, die nicht stark am Deckglas haften, beim Färben in der Immunfluoreszenz abgespült werden. Manchmal konnte man große Mengen an dichten Material, das zahlreiche Osteoklasten in einem Netz enthält, beobachten. Das zeigt sich besonders nach der Behandlung mit hohen Konzentration an Meltonin (1 μ M).

Das bedeutet, dass ein viel zu dichtes Wachstum erfolgt, dass nicht im automatischen TissueFaxs Programm erfasst werden konnte.

Das größte Problem bei der Kultivierung der Osteoklasten ist es, dass die Größe und die Ausbeute der Osteoklasten aus murinen Knochenmarkszellen extrem schwankt. Die Faktoren, die die Bildung der Osteoklasten hemmen, wurden analysiert. Bei der Verwendung des HEPES-Puffers wurde der pH-Wert von 7,4 auf 7,2 gesenkt. Aber es wurden keine Optimierung der Ausbeute beobachtet.

Osteoklastenbildung aus Knochenmark von weiblichen und männlichen Mäusen

Ein Faktor, der die Osteoklastenbildung beeinflussen könnte, ist das Geschlecht der Mäuse. Bei weiblichen Mäusen sollte die Osteoklastenbildung anders als bei männlichen sein, da Östrogene die Bildung von knochenabbauenden Zellen hemmen können. Beim Vergleich der Ausbeute konnte man klare Unterschiede zwischen den männlichen und weiblichen Mäusen entdecken. In der Abbildung 9 sieht man einen Osteoklasten aus dem Knochenmark einer männlichen Maus. Es entwickeln sich weniger, aber größere Osteoklasten. Demgegenüber ist in der Abbildung 10 eine höhere Anzahl an kleinen knochenabbauenden Zellen aus dem Knochenmark weiblicher Mäuse zu sehen.

Bei den Versuchsreihen konnte man bei weiblichen Mäusen deutlich eine Schwankung in der Ausbeute in den einzelnen Chargen sehen. Die Ursache dafür könnte in den Veränderungen der Hormonkonzentration liegen. Für eine statisch auswertbare Aussage müssen allerdings noch weitere Versuche durchführen.

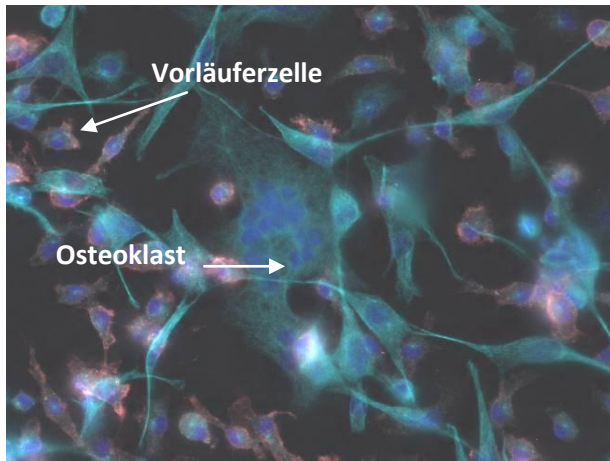


Abb.9.: Osteoklast aus dem Knochenmark einer männlichen Maus: Grün (α -Tubulin und Zytoskelett), Blau: Zellkern, Rot (F4/80 Rezeptor)

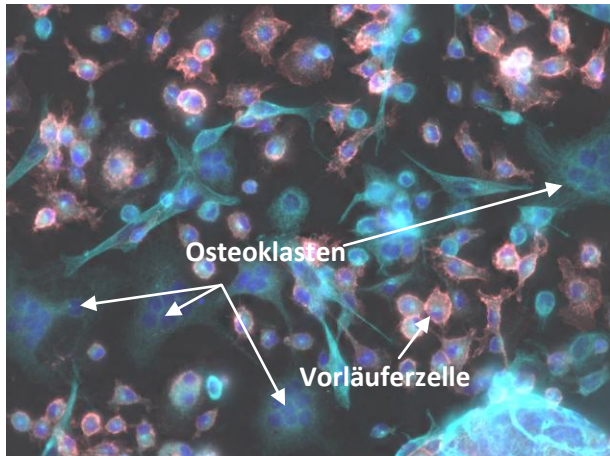


Abb.10: Mehrere Osteoklasten aus dem Knochenmark einer weiblichen Maus: Grün (α -Tubulin und Zytoskelett), Blau: Zellkern, Rot (F4/80 Rezeptor)

4.6 Automatischen Quantifizierung versus manuelle Auswertung

Nach der Immunfluoreszenzfärbung erfolgt die Aufnahme im TissueFaxs. Dann wurde eine manuelle Auswertung durch Zählen der Osteoklasten am virtuellen mikroskopischen Bild durchgeführt und das Ergebnis wurde mit dem der automatischen Analyse mittels der neu geschaffenen Software verglichen.

Es zeigte sich, dass durch die neu-entwickelte Software, viele Nicht-Osteoklasten als Osteoklasten (false positive) und andererseits viele Osteoklasten als Nicht-Osteoklasten (false negative) erkannt wurden.

Wie in der Abbildung 11 gezeigt, wurden bei "false positiv" mehrere Vorläuferzellen, die zu wenig F4/80 produzieren, als ein Osteoklast erkannt.

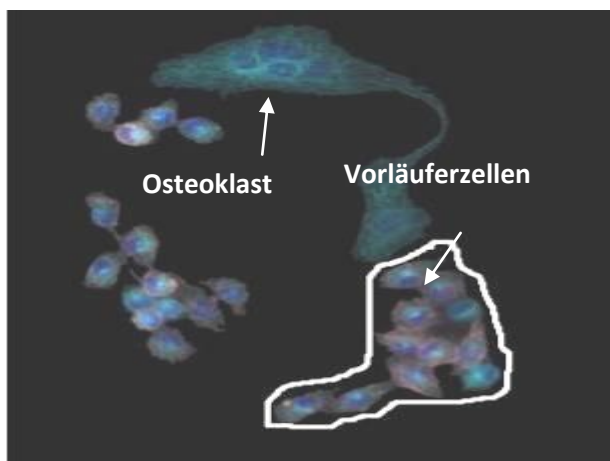


Abb.11: Fehler in der automatischen Auswertung Das Softwaresystem zur automatischen Auswertung der Osteoklasten erkennt als mehrere schwach mit F4/80 gefärbte Vorläuferzellen als einen Osteoklast mit elf Zellkernen (false positive).

Bei false negativ wurden die Osteoklasten nicht erkannt, wenn eine F4/80 exprimierende Zelle zu Nahe an einem Osteoklast liegt (siehe Abbildung 12)

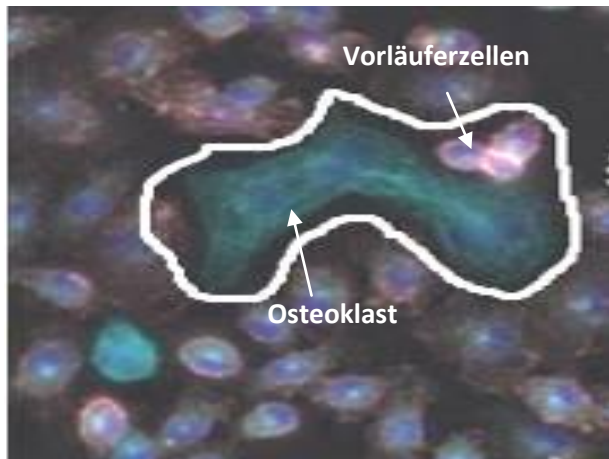


Abb.12: Fehler in der automatischen Auswertung: Die Software erkennt den Osteoklasten nicht. Er wird als eine Vorläuferzelle identifiziert, da sich Vorläuferzellen zu nahe an dem Osteoklast befinden und durch die Rotfärbung von F4/80 identifiziert werden. Der Osteoklast wird nicht identifiziert (false negative).

5 Zusammenfassung

Melatonin, das vor allem in der Zirbeldrüse synthetisiert wird, hat einen tageszeitlichen Rhythmus und wird hauptsächlich in der Nacht freigesetzt. Das Hormon steuert verschiedene physiologische und pathophysiologische Prozesse und unterstützt das Skelettwachstum und hemmt die Knochenresorption durch verminderte Expression von RANKL.

Die derzeitigen Auswertesystemen verursachen verschiedene Probleme, die eine automatische Bestimmung der Osteoklasten nicht ermöglichen. Zurzeit werden die Osteoklasten mit TRAP Färbung sichtbar gemacht. Nachteil dieser Methode ist es, dass die gefärbten Zellen für weitere Analyse nicht verwendet werden können. Außerdem ist diese Färbung sehr fehleranfällig und zeitintensiv. Die Multinuklearität der Osteoklasten ist ein anderes Problem für die automatische Quantifizierung. Daher soll ein neues automatisches Imageanalysesystem etabliert werden um die Osteoklasten zu erkennen und um die Wirkungen von Arzneistoffe und Hormone auf diese Zellen zu untersuchen. Diese Arbeit analysierte die Effekte von Melatonin auf die Differenzierung der Osteoklasten.

Die murinen Knochenmarkszellen und RAW 264.7 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Melatonin gemeinsam mit RANKL und M-CSF kultiviert. Bei 1µM haben sich Netzwerke gebildet, die mit dem automatischen Auswertesystem nicht bestimmt werden können. Bei Konzentrationen von 10 nM und 100 nM sind weniger Osteoklasten entstanden. Bei RAW 264.7 Zellen konnten mehr und größere Osteoklasten gezüchtet werden. Um die Osteoklasten von anderen Zellen zu unterscheiden, wurden spezifische Marker gefunden. Die verwendeten Antikörper waren gegen den Calcitoninrezeptor, α -Tubulin und Makrophagenantigen gerichtet. Jedoch hat der Antikörper gegen das Makrophagenantigen F4/80 nicht funktioniert.

Im Ganzen kann man sagen, dass für die Quantifizierung von Osteoklasten ein automatisches Imageanalysesystem etabliert wurde, mit dem man die Wirkungen von Melatonin auf die Osteoklastogenese untersuchen konnte. Mithilfe dieses Systems sollen weitere Stoffe und Hormone, die das Osteoklastenwachstum beeinflussen, untersucht werden.

6 Abstract

Melatonin, which is synthesized primarily in the pineal gland, is released mainly at night. This hormone controls various physiological and pathophysiological processes and supports skeletal growth and inhibits bone resorption by decreased expression of RANKL.

The current automatic image analysis systems cause is based on the cell recognition by single nuclei and, therefore, does not allow an automatic determination of multinucleated osteoclasts. Currently, osteoclasts are visualized by TRAP staining and their number is determined by manual counting. The disadvantage of this method is that the manual counting is time consuming and error-prone. Furthermore, stained cells can not be used for further analysis for expressed proteins.

Therefore a new automatic image analysis system was generated, which recognizes osteoclasts based on cell membrane and cytoplasmic markers as well as on the number of nuclei. It should be suitable for the investigation of the effects of drugs and hormones on these cells. To evaluate this program and to analyze the effects of melatonin on the differentiation of osteoclasts, the new image analysis system was tested. To distinguish the osteoclasts from other cells, specific markers were found. Antibodies were used directed against the calcitonin receptor, α -tubulin and macrophage antigen. To test the system and evaluate the effect of melatonin on osteoclast formation, murine bone marrow cells and RAW 264.7 cells were cultured with various concentrations of melatonin together with RANKL and M-CSF. At concentrations of 10 nM and 100 nM Melatonin, the formation of osteoclasts was impaired. At 1 μ M melatonin, networks of osteoclasts were formed, but these networks could not be determined with the automatic evaluation system. Cultivation of RAW 264.7 cells led to the formation of large multinucleated osteoclast-like cells, which could be counted by the automated image analysis system.

Taken together, the data show that the automatic image analysis system for the quantification of osteoclasts is suitable to study the effects of hormones like melatonin on the formation of osteoclasts. Application of this system will allow to investigate the effect of various substances and hormones on osteoclastogenesis and to determine their effect on the growth of multinucleated cells.

7 Literaturverzeichnis

- ¹ Wolfgang Clauss, Cornelia Clauss. Humanbiologie kompakt. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg. 2009. 64-67
- ² Reiner Bartl. Osteoporose-Manual: Diagnostik, Prävention und Therapie. 2. Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. 2004. 1-35
- ³ Edith Leisten. Osteoporose handeln bevor der Knochen bricht. Books on Demand GmbH Verlag. Norderstedt. 2009. 27-28
- ⁴ Matthew L Broadhead, Jonathan CM Clark, Crispin R Dass, Peter FM Choong, Damian E Myers. Therapeutic targeting of osteoclast function and pathways. Expert Opinion. 2011. 15:169-181
- ⁵ Jörg Jerosch, Augustinus Bader, Günter Uhr. Knochen: Curarsan Taschenatlas spezial. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. 2002. 20
- ⁶ G.David Roodman. Cell biology of the osteoclast. Experimental Hematology 1999. 27:1229-1241
- ⁷ Thomas Mansholt. Osteoporose-Erkennung und Vorsorge pathologisch-knocherner Substanzverluste. GRIN Verlag. Norderstedt. 2007. 23
- ⁸ Robert F.Schmidt, Florian Lang, Gerhard Thews. Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. 29. Auflage. Springer-Verlag. Tokyo. 1994. 744
- ⁹ Erwin-Josef Speckmann. Physiologie: Mit Zugang zum Elsevier-Portal. 5. Auflage. Fischer Verlag. München. 2008. 762
- ¹⁰ Heinz Lüllmann, Klaus Mohr, Lutz Hein. Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen – Medikamente gezielt einsetzen. 17. Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. 2010. 411-412
- ¹¹ A.A. Kurth, L. Hovy, T.Hennigs. Bisphosphonattherapie von Knochenerkrankungen: Tumorosteolysen, Osteoporose, Morbus Paget, Endoprothetik. Steinkopff Verlag. Darmstadt. 2001. 49
- ¹² M.Wuelling, C.Engels, N.Jesse, M.Werner, E.Kaiser, G.Delling. Aktuelles zur Histogenese des Riesenzelltumors. Pathologie. 2002. 23:332-339
- ¹³ Horst Lorenz. Anti-Aging Wunschtraum oder Wirklichkeit?. Books on Demand GmbH. Norderstedt. 2008. 45-48
- ¹⁴ S.R.Pandi-Perumal, V.Srinivasan, G.J.M. Maestroni, D.P.Cardinali, B.Poeggeler, R. Hardeland. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? Federation of European Biochemical Societies. 2006. 273: 2813-2838

- 15 Miyamoto T, Suda T. Differentiation and function of osteoclasts. *The Keio Journal of Medicine*. 2003. 52:1-7
- 16 Yagi M, Miyamoto T, Sawatani Y, et al. DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2005. 202:345-51
- 17 Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 2002. 22:549-53
- 18 Pfeilschifter J, Chenu C, Bird A, Mundy GR, Roodman GD. Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclast-like cells in vitro. *The Journal of Bone and Mineral Research*. 1989. 4:113-8
- 19 Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, Inada T, Sudo T, Brasel K, Miyata T, Anderson DM, Suda T. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. *The Journal of Experimental Medicine*. 1999. 190:1741-54.
- 20 Takahashi N, MacDonald BR, Hon J, Winkler ME, Derynck R, Mundy GR, Roodman GD. Recombinant human transforming growth factor-alpha stimulates the formation of osteoclast-like cells in long-term human marrow cultures. *The Journal of Clinical Investigation*. 1986. 78:894-8.
- 21 Mundy GR. The effects of TGF-beta on bone. *Ciba Foundation symposium*. 1991. 157:137-43; discussion 143-51.
- 22 Brandi ML, Hukkanen M, Umeda T, Moradi-Bidhendi N, Bianchi S, Gross SS, Polak JM, MacIntyre I. Bidirectional regulation of osteoclast function by nitric oxide synthase isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*. 1995. 92:2954-8.
- 23 Hakeda Y, Kobayashi Y, Yamaguchi K, Yasuda H, Tsuda E, Higashio K, Miyata T, Kumegawa M. Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1998. 251:796-801.
- 24 Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Ozawa H. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1998. 247:610-5.
- 25 Lee SK, Goldring SR, Lorenzo JA. Expression of the calcitonin receptor in bone marrow cell cultures and in bone: a specific marker of the differentiated osteoclast that is regulated by calcitonin. *Endocrinology*. 1995. 136:4572-81

- 26 Alfred A. Reszka†, Judit M. Halasy-Nagy, Patricia J. Masarachia and Gideon A. Rodan. Bisphosphonates act directly on the osteoclast to induce caspase cleavage of mst1 kinase during apoptosis. A link between inhibition of the mevalonate pathway and regulation of an apoptosis-promoting kinase. The Journal of Biological Chemistry.1999. 274:34967-73.
- 27 Hill DA, Hill SR. Counseling patients about hormone therapy and alternatives for menopausal symptoms. American Family Physician. 2010. 82:801-7.
- 28 Goldring SR, Roelke MS, Petrisson KK, Bhan AK. Human giant cell tumors of bone identification and characterization of cell types. The Journal of Clinical Investigation. 1987. 79:483-91.
- 29 Lee MJ, Sallomi DF, Munk PL, Janzen DL, Connell DG, O'Connell JX, Logan PM, Masri BA. Pictorial review: giant cell tumours of bone. Clinical Radiology. 1998. 53:481-9.
- 30 Zheng MH, Robbins P, Xu J, Huang L, Wood DJ, Papadimitriou JM. The histogenesis of giant cell tumour of bone: a model of interaction between neoplastic cells and osteoclasts. Histology and Histopathology. 2001. 16:297-307.
- 31 Komiya S, Sasaguri Y, Inoue A, Nakashima M, Yamamoto S, Yanagida I, Morimatsu M. Characterization of cells cultured from human giant-cell tumors of bone. Phenotypic relationship to the monocyte-macrophage and osteoclast. Clinical Orthopaedics and Related Research. 1990. 258:304-9.
- 32 Sasaguri Y, Komiya S, Nakano R, Yanagi H, Fukuda S, Inoue A, Morimatsu M. Secretion of matrix metalloproteinases in cultured stromal cells isolated from a giant cell tumor of bone. Matrix Supplement. 1992. 1:412.
- 33 Sasaguri Y, Komiya S, Sugama K, Suzuki K, Inoue A, Morimatsu M, Nagase H. Production of matrix metalloproteinases 2 and 3 (stromelysin) by stromal cells of giant cell tumor of bone. The American Journal of Pathology. 1992. 141:611-21.
- 34 Karmakar S, Kay J, Gravallesse EM. Bone damage in rheumatoid arthritis: mechanistic insights and approaches to prevention. Rheumatic Diseases Clinics of North America. 2010. 36:385-404.
- 35 Van bezooijen RL, Farih-Sips HC, Papapoulos SE, Löwik CW. Interleukin-17: A new bone acting cytokine in vitro. The Journal of Bone and Mineral Research. 1999. 14:1513-21.
- 36 Haynes DR, Crotti TN, Loric M, Bain GI, Atkins GJ, Findlay DM. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) regulate osteoclast formation by cells in the human rheumatoid arthritic joint. Rheumatology. 2001. 40:623-30.

- 37 Guise TA, Chirgwin JM. Transforming growth factor-beta in osteolytic breast cancer bone metastases. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2003. 415:32-8.
- 38 Klein DC. Arylalkylamine N-acetyltransferase: "the Timezyme". *Journal of Biological Chemistry*. 2007. 282:4233-7.
- 39 Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*. 2005. 27:101-10.
- 40 Hardeland R. Melatonin: Signalmechanismen eines pleiotropen Agenten. *Biofactors*. 2009. 35:183-92.
- 41 Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999. 274:22041-7.
- 42 Histing T, Anton C, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Pohlemann T, Menger MD. Melatonin impairs fracture healing by suppressing RANKL-mediated bone remodeling. *The Journal of Surgical Research*. 2012. 173:83-90.
- 43 Cardinali DP, Ladizesky MG, Boggio V, Cutrera RA, Mautalen C. Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives. *The Journal of Pineal Research*. 2003. 34:81-7.
- 44 Herbert F.Wolf, Klaus H. Rateitschak. *Farbatlant der Zahnmedizin 1 – Parodontologie*. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. 2004. 186

8 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Differenzierung von mesenchymalen und hämatopoetischen Stammzellen
- Abbildung 2: Entwicklung von Osteoklasten aus hämatopoetischen Stammzellen
- Abbildung 3: Melatoninstruktur
- Abbildung 4: Bildung von Melatonin
- Abbildung 5: direkte und indirekte Immunfluoreszenzfärbung
- Abbildung 6: Automatische Identifizierung von Osteoklasten mit der Software
- Abbildung 7: Wirkung von Melatonin auf das Osteoklastenwachstum
- Abbildung 8: Riesenosteoklasten bzw. Multinukleäre Makrophagen in RAW 264.7 Zelllinie
- Abbildung 9: Osteoklasten aus einer männlichen Maus
- Abbildung 10: mehrere Osteoklasten aus einer weiblichen Maus
- Abbildung 11: false positiv
- Abbildung 12: false negativ

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: das Pipettierschema

Tabelle 2: das verwendete Platten-Layout

Tabelle 3: Liste der Antikörper

10 Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name:	Dilek Kalayci
Geburtsdatum:	30.08.1984
Geburtsort:	Baden
Staatsbürgerschaft:	Österreich
Familienstand:	ledig

Schulausbildung

1991-1995	Volksschule Leobersdorf
1995-1999	Hauptschule Leobersdorf
1999-2004	Handelsakademie Baden
2005-2012	Universität Wien, Pharmazie

Sonstiges

Sprachen: deutsch, englisch, französisch, türkisch in Wort und Schrift,

SAP-Grundkenntnisse

ECDL

Führerschein B