



universität
wien

Diplomarbeit

Titel der Diplomarbeit

Einfluss von Roburin A und D auf die
Signaltransduktion, Zelldifferenzierung
und Aktivität von Osteoklasten in vitro

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasser:	Michael Schnattinger
Matrikel-Nummer:	0201360
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	A449 Pharmazie
Betreuer:	Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Oskar Hoffmann

Wien, am 28.Juli.2009

Ich danke Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Oskar Hoffmann für die kompetente fachliche Betreuung und die Möglichkeit mich mit diesem interessanten Thema auseinanderzusetzen.

Ich danke Frau Flora Tedjotsop Feudjio für ihre tatkräftige Unterstützung, Hilfsbereitschaft und Geduld.

Ich danke Frau Barbara Berger und Herrn Peter Höflich für ihre Führung und ihren unermüdlichen Einsatz.

Ich danke Barbara Stelzmüller, Daniel Danninger und Francesco Ringressi für ihre Kameradschaft, die Möglichkeit zum fachlichen Austausch und das entspannte Arbeitsumfeld.

Ich danke meinen Eltern und Schwestern für die Ermöglichung meines Ausbildungsweges und ihre liebevolle Unterstützung.

Ich danke Nicole Ivon Storczer für ihren geistigen Beistand und die Begleitung auf einem steinigen Stück Weges.

Liste der verwendeten Abkürzungen

1 α ,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃	1 α ,25-Dihydroxycholecalciferol
AP-1	Activator protein-1
APC	adenomatous polyposis coli
APS	Ammoniumpersulfat
BMP	Bone morphogenetic proteins
BRU	Bone Remodeling Unit
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca ²⁺	Kalzium-Ionen
cGMP	cyclisches Guanosin-5'-monophosphat
CK1	casein kinase 1
Dkk	Dickkopf
EGFR	Epidermal Growth Factor Rezeptor
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FCS	Fetales Kälberserum
GSK3	glycogen synthase kinase 3
GTPase	Guanosintriphosphatase
HCl	Salzsäure
HDL	High-density-lipoprotein
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]- ethansulfonsäure
HHDP	3,4,5,3',4',5'-Hexahydroxydiphenoyl
HIF-1 α	Hypoxia-inducible-Factor-1 α
HI-Virus	Human-Immunodeficiency-Virus
HSV	Herpes Simplex Virus
IGF	Insulin like Growth Factor
IgG	Immunglobulin G
JNK	c-Jun N-terminal kinases
LDL	Low-density-lipoprotein
LEF/TCF	Lymphoid enhancer-binding factor 1/T cell- specific transcription factor

LiCl	Lithiumchlorid
Lrp	Low-density-Lipoprotein receptor-related proteins
MAPK	Mitogen associated protein kinase
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein 1
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
A-MEM	Minimal Essential Medium, α -Modifikation
Mg ²⁺	Magnesium-Ionen
MIP α	Macrophage Inflammatory Protein 1 α
NaCl	Natriumchlorid
NAF	Natriumfluorid
NaN ₃	Natriumazid
NCP	Nichtkollagene Proteine
NFAT	Nuclear factor for activated T cells
NF- κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NHTP	2,3,5-Nonahydroxyterphenoyl
NO	Stickstoffmonoxid
OPG	Osteoprotegerin
PI-3-K	Phosphoinositol-3-Kinase
PIT	Point of intensive transformation
PMSF	Phenylmethylsulfonsäure
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PTHrP	Parathormon-related Protein
RANK	Receptor activator of NF- κ B
RANKL	Receptor activator of NF- κ B ligand
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
Runx2	Runt-related transcription factor 2
SDS	Sodiumdecylsulfat
Src	Rous Sarcoma virus oncogene
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances
TBS	Tris-Puffered Saline Solution

TBS-T 0,1%	Tris-Puffered Saline Solution mit Tween-20
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor necrosis factor
TRAP	Tartrate resistant acid phosphatase
Tris-Base	Trihydroxymethylaminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
VEGF	Vascular endothelial growth Factor
Wnt	Wingless-Ints
β -TrCP	β -transducin-repeat containing protein

Inhaltsverzeichnis

1.Einführung	9
1.1 Pflanzliche Polyphenole - Ellagitannine	9
1.1.1 Systematische Einteilung der Polyphenole	9
1.1.2 Eigenschaften hydrolysierbarer Tannine	12
1.1.3 Vorkommen von Ellagitanninen	12
1.1.4 Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Ellagitanninen	13
1.1.4.1 Urolithine – Metabolite der Ellagitannine	13
1.1.5 Toxikologisches Profil	17
1.1.6 Bedeutung der Ellagitannine	18
1.1.6.1 Bedeutung in der Lebensmitteltechnologie	18
1.1.6.2 Bedeutung aus medizinisch-pharmazeutischer Sicht	19
1.1.6.2.1 Effekte auf Herz und Blutkreislauf	19
1.1.6.2.2 Antivirale Eigenschaften	22
1.1.6.2.3 Beeinflussung des Zellwachstums	23
1.1.6.2.4 Knochenspezifische Effekte	27
1.1.7 Ellagitannin-Dimere und Knochenmetabolismus	29
1.2 Knochen und Knochenzellen	30
1.2.1 Das menschliche Skelett	30
1.2.2 Die Anatomie des Knochens	30
1.2.3 Die Funktionen des Knochens	34
1.2.4 Knochenmodeling und -remodeling	35
1.2.5 Zelllinien mit wesentlichen Funktionen am Knochen	38
1.2.5.1 Vertreter der Osteoblasten-Zelllinie	38
1.2.5.2 Osteoklasten und deren Funktion während des	
Knochenumbaus	44
1.2.6 Wnt-Signaling – ein wesentlicher Faktor des Knochen-	
metabolismus	50
1.2.6.1 Die kanonische Signalkaskade	50

1.2.6.2 Die nicht-kanonische Signalkaskade	51
1.2.6.3 Einflussfaktoren des Wnt-Signaling	52
1.2.6.4 Wnt-Signaling und Knochenzellen	52
1.2.6.4.1 Osteoblasten	52
1.2.6.4.2 Osteoklasten	54
1.3 Ziele der Diplomarbeit	55
2.Materialien und Methoden	56
2.1 Materialien	56
2.1.1 Geräteliste	56
2.1.2 Substanzenliste	57
2.1.3 Puffer und Lösungen	58
2.1.4 Kulturmedien	60
2.1.5 Verwendete Zelllinien	60
2.1.5.1 Zelllinien zur Durchführung des Pit-Assay	60
2.1.5.2 Zelllinien der Signaltransduktionsuntersuchungen	61
2.2 Methoden	61
2.2.1 Pit-Assay	61
2.2.1.1 Co-Kultur	61
2.2.1.2 Pit-Assay	62
2.2.1.3 Auswertung des Resorptionsausmaßes	64
2.2.2 Signaltransduktionsuntersuchungen	66
2.2.2.1 Zell-Kultur	66
2.2.2.2 Lyse, Proteinextraktion und Proteinassay	67
2.2.2.3 SDS-Gel-Elektrophorese	69
2.2.2.4 Transfer	69
2.2.2.5 Western-Blot	70
2.2.2.6 Methoden zur Auswertung des Western-Blot	72
2.2.2.7 Stripping und Reprobing	73

3.Resultate	74
3.1 Wichtige Hinweise zu den Resultaten	74
3.1.1 Ermittlung des Resorptionsausmaßes	74
3.1.2 Ansäuern der Co-Kultur	74
3.2 Roburin A	76
3.2.1 Ergebnisse des Pit-Assay	76
3.2.1.1 Resorptionsquoten bei Standard-pH der Co-Kultur	76
3.2.1.2 Untersuchungen zur Säurestabilität von Ellagitanninen am Beispiel von Roburin A	78
3.2.1.3 Vergleich der Hemmwirkung bei Standard-pH sowie nach Ansäuern der Kultur	79
3.2.2 Ergebnisse der Signaltransduktionsuntersuchungen	80
3.3 Roburin D	83
3.3.1 Ergebnisse des Pit-Assay	83
3.3.1.1 Resorptionsquoten bei Standard-pH der Co-Kultur	83
3.3.1.2 Untersuchungen zur Säurestabilität von Ellagitanninen am Beispiel von Roburin D	85
3.3.1.3 Erkenntnisse, die durch das Ansäuern der Kultur gewonnen wurden	86
3.3.2 Ergebnisse der Signaltransduktionsuntersuchungen	87
4.Zusammenfassung	90
5.Diskussion	92
6.Literaturverzeichnis	101
7.Index der Abbildungen und Tabellen	105
8.Curriculum Vitae	107

1. Einleitung

1.1 Pflanzliche Polyphenole - Ellagitannine

Polyphenole pflanzlichen Ursprungs sind ubiquitär verbreitete Bestandteile der Nahrung und sorgen durch ihre adstringierenden Eigenschaften für den charakteristischen Geschmack zahlreicher Genussmittel wie Wein oder Whisky. Neben ihren geschmacklichen Attributen werden pflanzliche Polyphenole auch wegen ihres Einsatzes beim Gerben von Tierhaut geschätzt. Daher stammt auch der Name dieser heterogenen Substanzgruppe, Tannine. Weiters dienen Polyphenole von alters her zur Herstellung von Farben und Tinten. (Niemetz und Gross, 2005)

1.1.1 Systematische Einteilung der Polyphenole

Die Familie pflanzlicher Polyphenole, in weiterer Folge als Tannine bezeichnet, teilt sich in zwei Gruppen. Auf der einen Seite die kondensierten Tannine, die sich von den Flavonoiden ableiten, auf der anderen Seite die hydrolysierbaren Tannine, die Ester der Gallensäure mit einem Polyol darstellen. Der einfachste Vertreter dieser Gruppe ist das β -Glucogallin. Durch zunehmende Substitution mit Gallensäuremolekülen entsteht die maximal-substituierte Verbindung 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-Glucopyranose. Die mono- bis penta-substituierten Vertreter werden als Einfache Galloylglucosen bezeichnet. Diese stehen den Komplexen Galloylglucosen, den Gallotanninen, gegenüber. Die Gallotannine werden hierbei durch Addition weiterer Gallensäurereste an die Pentagalloylglucose gebildet. Hierdurch entstehen hochmolekulare Verbindungen mit zehn oder mehr Gallensäureresten. Durch Oxidationsreaktionen kommt es zur Brückenbildung zwischen benachbarten Gallensäureresten und dadurch zur Ausbildung von 3,4,5,3',4',5'-Hexahydroxydiphenoyl-Einheiten. Die solchermaßen gebildeten Verbindungen bilden die zweite Gruppe der hydrolysierbaren Tannine, die Ellagitannine. (Niemetz und Gross, 2005)

Sie bestehen aus einem zentralen Zuckermolekül, meistens β -D-Glucopyranose, das über Esterbindungen mit mehreren Gallensäuremolekülen vernetzt vorliegt.

Die Gallensäurebausteine wiederum sind über Kohlenstoff-Kohlenstoff bzw. Kohlenstoff-Sauerstoff Etherbrücken untereinander verbunden. (Quideau et al., 2004)

Neben der intramolekularen Brückenbildung zeigen Ellagitannine auch starke Tendenzen zur Bildung dimerer und oligomerer Verbindungen durch die Ausbildung intermolekularer Brücken. (Niemetz und Gross, 2005)

Eine Untergruppe der Ellagitannine besteht aus Molekülen, die neben den HHDP-Einheiten auch noch 2,3,5-Nonahydroxyterphenoyl-Bausteine umfassen und um einen offenkettigen Glukose-Kern aufgebaut sind. (Quideau et al., 2005; Quideau et al., 2004)

Diese funktionellen Einheiten sind Bestandteile von elf- und zwölfgliedrigen Ringen, die diesen Ellagitanninen strenge stereochemische Eigenschaften bescheren. Durch diese besonderen Struktureigenschaften ist diese Untergruppe der Ellagitannine besonders gut geeignet bestimmte Zielproteine, wie etwa von Viruspartikeln, zu erkennen. (Quideau et al., 2005)

Die Synthese von Ellagitanninen mit NHTP-Struktur geht von der β -Pentagalloylglucose aus. Durch oxidative Bildung von HHDP-Einheiten an den Positionen 2,3 und 4,6 entsteht aus dieser Vorläuferverbindung Pedunculagin. Durch Abspaltung des Gallensäurerestes an Position 5 entsteht Liquidambin mit seiner charakteristischen Aldehydgruppe. Weitere C-Glykosylierung führt zum Einbau eines freien Gallensäurerestes und somit zur Bildung von Casuarinin und dessen Epimer Stachyurin. Durch oxidative Verknüpfung des freien Galloylrestes mit der 2,3-HHDP-Einheit kommt es zur Bildung von Vescalagin und Castalagin, den ersten Vertretern mit einer NHTP-Einheit. Nukleophile Substitution an der Hydroxylgruppe des C-1 des Zuckers dieser monomeren Verbindungen führt zur Bildung von Dimeren und Lyxose bzw. Xylose enthaltenden Ellagitanninen. Diese Substitutionsreaktionen laufen unter stereochemischer Kontrolle ab und führen zur Bildung von Grandinin sowie den Roburinen A bis E. (Quideau et al., 2004)

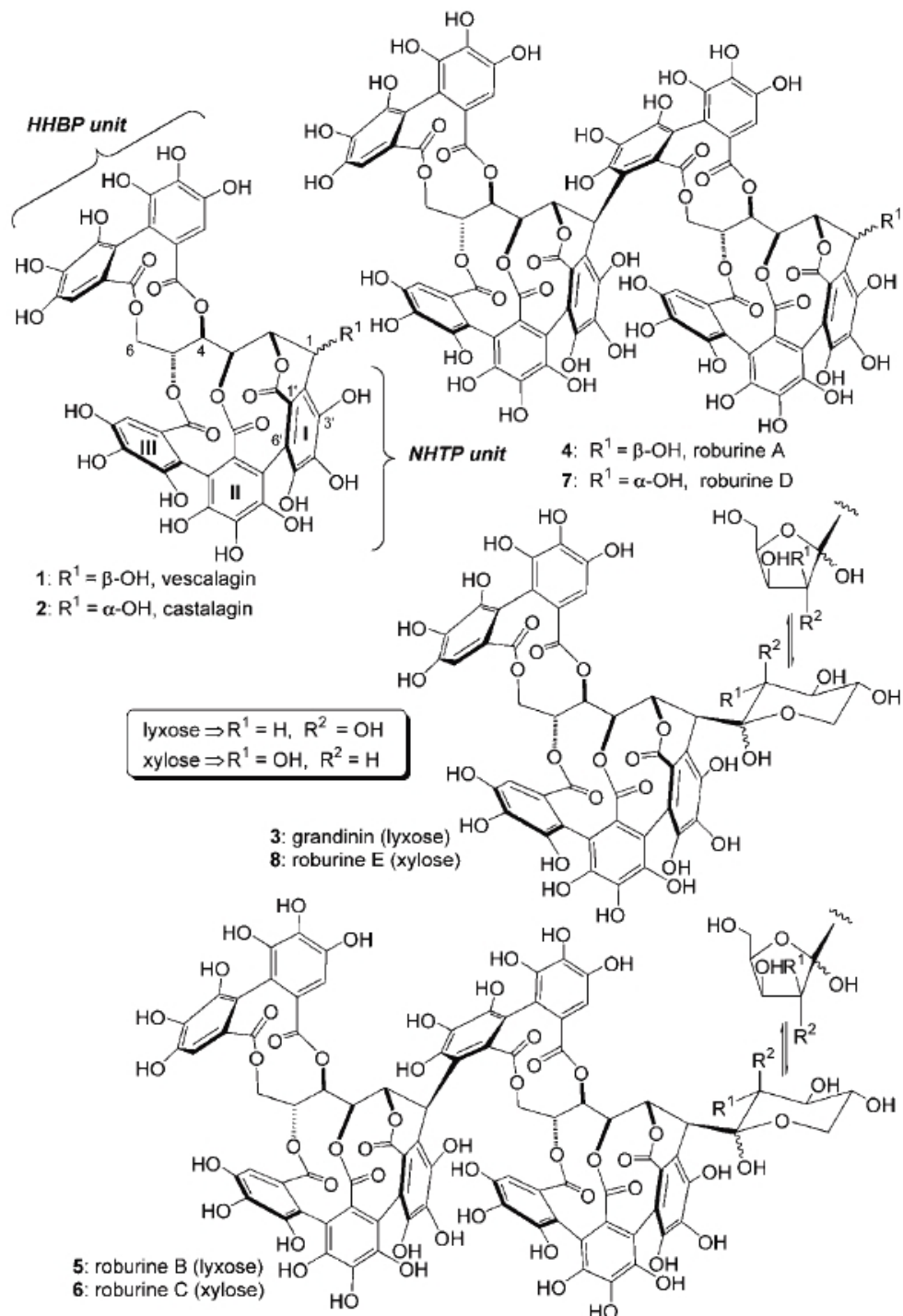


Abbildung 1: Die acht wesentlichen, NHTP-Gruppen-umfassenden Ellagitannine aus dem Holz von *Castanea* und *Quercus*-Arten (Quideau et al., 2005)

1.1.2 Eigenschaften hydrolysierbarer Tannine

Ellagitannine teilen sich viele ihrer Eigenschaften mit den Procyanidinen. Sie sind in Wasser gut löslich, haben ein hohes Molekulargewicht und fällen Proteine und Alkaloide aus ihrer Lösung. Säuren oder Basen hydrolysieren die Esterbindungen der Ellagitannine wobei die HHDP-Einheiten als Hexahydroxydiphensäure abgespalten und spontan in das wasserunlösliche Bisketon Ellagsäure umgesetzt werden. (Espin et al., 2007; Fridrich et al., 2008; Niemetz und Gross, 2005)

1.1.3 Vorkommen von Ellagitanninen

Ellagitannine sind natürliche Bestandteile von vielen, als Nahrungsmittel genutzten Pflanzen. Darunter fallen zahlreiche Nußfrüchte wie die, Pedunculagin enthaltende, Walnuß, weiters Haßelnuß und Mandel sowie einige Beerenfrüchte, wie Sanguin H-6 enthaltende Erdbeeren und Himbeeren, sowie die Muskatellertraube mit dem Inhaltsstoff Sanguin H-5. (Espin et al., 2007; Fridrich et al., 2008; Heber, 2008) Weitere Quellen von Ellagitanninen sind Pfirsiche, Zwetschken und Khakifrüchte. (Cerdeja et al., 2005)

Granatäpfel (*Punica granatum*) zeichnen sich durch einen besonders hohen Gehalt an Ellagitanninen aus. Dieser, Punicalagin genannte Vertreter der hydrolysierbaren Tannine, kommt in der Fruchtschale des Granatapfels vor und wird durch Pressen der Frucht in einer Quantität von mehr als 2 g pro Liter Saft gewonnen. Punicalagin kommt exklusiv im Granatapfel vor und bildet zusammen mit Punicalin eine Untergruppe der Ellagitannine. (Heber, 2008)

In pflanzlichen Geweben kommen Ellagitannine in Kombination mit Ellagsäure vor. (Fridrich et al., 2008) Vertreter der NHDP-enthaltenden Ellagitannine sind im Holz von *Fagaceae*, *Myrtaceae*, *Melastomataceae*, *Lythraceae* sowie *Combretaceae* zu finden. (Quideau et al., 2005; Quideau et al., 2004) Das Hartholz von Eichen- und Kastanienarten enthält hohe Anteile an Castalagin und seinem C-1 Epimer Vescalagin (bis zu 6% des Trockengewichts) sowie Grandinin und Roburin A bis E. (Quideau et al., 2005) Die genaue Zusammensetzung und die Konzentrationen der einzelnen Stoffe sind von Spezies und Standort des Ursprungsbaums abhängig. (Fridrich et al., 2008)

Auch in zahlreichen alkoholischen Getränken wie Whisky und in Barriquefässern gereiften Weinen sind Ellagitannine zu finden, da es während des Reifungsprozesses zum Übergang der phenolischen Verbindungen aus dem Holz der Eichenfässer in die Alkohol-Wasser-Mischung des Genussmittels kommt. (Espin et al., 2007)

1.1.4 Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Ellagitanninen

Studien lassen darauf schließen, dass die über die Nahrung zugeführten Ellagitannine nicht in ihrer ursprünglichen Form aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert werden. Nur bei massiver Zufuhr an Ellagitanninen aus dem Granatapfel konnte während toxikologisch orientierter Untersuchungen Punicalagin in Plasma und Urin von Mäusen nachgewiesen werden. An Menschen durchgeführte Studien erbrachten keinen Hinweis auf die Resorption der ursprünglichen Verbindungen bei oraler Gabe von Ellagitanninen. Unter physiologischen Bedingungen des Magen-Darm-Traktes wird in humanen Zellen Ellagsäure aus den Ellagitanninen freigesetzt. Dieser Vorgang läuft spontan bei dem, im Dünndarm vorherrschenden, pH-Wert ab. Über die Nahrung zugeführte Ellagsäure wird beim Menschen allerdings nur zögerlich aus dem Darm resorbiert, wie Untersuchungen mit Granatapfelsaft und dem Extrakt schwarzer Himbeeren zeigten (Espin et al., 2007)

Cerdá et.al. konnten nach der Einnahme von ellagsäurehaltigen Fruchtsäften keinerlei Absorption der freien Ellagsäure feststellen. Dieser Umstand mag darauf zurückzuführen sein, dass bestimmte Faktoren die Resorption der freien Ellagsäure beeinflussen. Zu diesen Faktoren könnten die Zusammensetzung des Nahrungsmittels, die Dosis an enthaltener Ellagsäure sowie interindividuelle Unterschiede zählen. Außerdem ist bekannt, dass Ellagsäure eine ausgeprägte Tendenz zur Adsorption an das Darmepithel aufweist. (Espin et al., 2007)

1.1.4.1 Urolithine – Metabolite der Ellagitannine

Im Magen-Darm-Trakt werden Ellagitannine, vermutlich durch Bakterien der Darmflora, in die Dibenzopyranone Urolithin A und B umgesetzt. Diese Metabolite liegen 24 bis 48 Stunden nach der Einnahme ellagitanninreicher Kost

in Plasma und Urin als glucuronidierte Form in ihren höchsten Konzentrationen vor. Im Urin sind Urolithine bis zu 72 Stunden nachweisbar. (Espin et al., 2007)

Die Ausscheidung von Ellagitanninen erfolgt beim Menschen, unabhängig von Quelle und Art der aufgenommenen Ellagitannine, in Form von Urolithin B und dessen Derivaten, was darauf schließen lässt, dass nur der, in der Verbindungsklasse ubiquitär vorhandene, Ellagsäurerest für die Bildung der Urolithine maßgeblich ist. Die Ausscheidung erfolgt in den meisten Fällen etwa 16 Stunden nach Einnahme des Ellagitannins und hält über mindestens 40 Stunden an. (Cerdeja et al., 2005)

Die lange Verweildauer der Metabolite im Urin lässt auf eine geringe renale Clearance schließen, welche auf einen enterohepatischen Kreislauf zurückgeführt wird. Die Verteilung der Metabolite in den Körpergeweben wurde erstmals an Ratten untersucht, wobei Urolithine in Leber und Niere nachgewiesen werden konnten. Weitere kinetische Untersuchungen wurden an *Sus ibericus*, einem Modelltier, dessen Verdauungstrakt dem des Menschen überaus ähnlich ist, unternommen. Fleisch und Fett dieser Schweine stehen im Ruf besonders resistent gegenüber Verderben durch Oxidation und Ranzig-Werden zu sein. Dieser Umstand wird teilweise auf die Ernährung der Schweine mit ellagitanninreichen Eicheln zurückgeführt. Allerdings war es im Verlauf der Studie nicht möglich Polyphenole aus den Eicheln in Fett- und Muskelgewebe der Tiere nachzuweisen, so dass diese Erklärung für die Resistenz gegenüber Oxidationsvorgängen nicht zutreffend scheint. (Espin et al., 2007)

Im Körpergewebe der Schweine konnten 31 verschiedene Ellagitannin-Metabolite identifiziert werden. Dazu zählten Metabolite der Ellagsäure sowie die mikrobiell gebildeten Urolithine. Die Studie zeigte, dass Ellagsäure unter physiologischen Bedingungen *in vivo* aus Ellagitanninen freigesetzt wird und im Verlauf des Magen-Darmtraktes über die Zwischenschritte Urolithin D und C in die Urolithine A und B umgewandelt wird. Im Verlauf der Darmpassage werden Hydroxylgruppen der durch Hydrolyse von Ellagitanninen gewonnenen Ellagsäure sukzessive abgespalten, wodurch die Lipophilie der Metabolite zunimmt und deren Resorption aus dem Darmlumen begünstigt wird. Dieser Prozess beginnt im Jejunum und findet seinen Abschluss in den distalen Arealen

des Darmes. Urolithin B und D werden bereits in frühen Darmabschnitten resorbiert und gehen, mit dem Ziel phenolische, hydrophile Hydroxylgruppen zu reduzieren, in einen enterohepatischen Kreislauf ein. Einmal absorbiert, erfolgt der erste Glucuronidierungsschritt der Metabolite in den Darmzellen. Weitere Metabolisierung der Substanzen erfolgt in der Leber durch Bildung von Sulfaten oder Diglucuroniden, die in die Galle sezerniert werden. Urolithin B, der vermutete Endpunkt der Metabolisierung im Darm, ist weder in Galle noch Feces nachweisbar, da es nur eine einzelne Glucuronidierungsstelle aufweist und sofort in den Urin übergeht. In Plasma und Urin sind, neben Ellagsäure-dimethyletherglucuronid, vor allem die Urolithine A und B sowie deren Glucuronide anzutreffen. Urolithin A ist der hauptsächlich in den Feces von Mensch und Schwein auffindbare Ellagitannin-Metabolit. (Espin et al., 2007)

Im Gegensatz dazu konnte Urolithin B auch in den Feces von *Trogopterus xanthippes* festgestellt werden. Die Ausscheidungsprodukte dieser Eichhörnchenart werden in der traditionellen chinesischen Medizin schon seit langem bei Blutstau und Allergien eingesetzt. Dies deckt sich mit den kürzlich gewonnen Erkenntnissen, dass Urolithin B antiangiogene und hyaluronidasehemmende Eigenschaften besitzt. (Cerdeja et al., 2005)

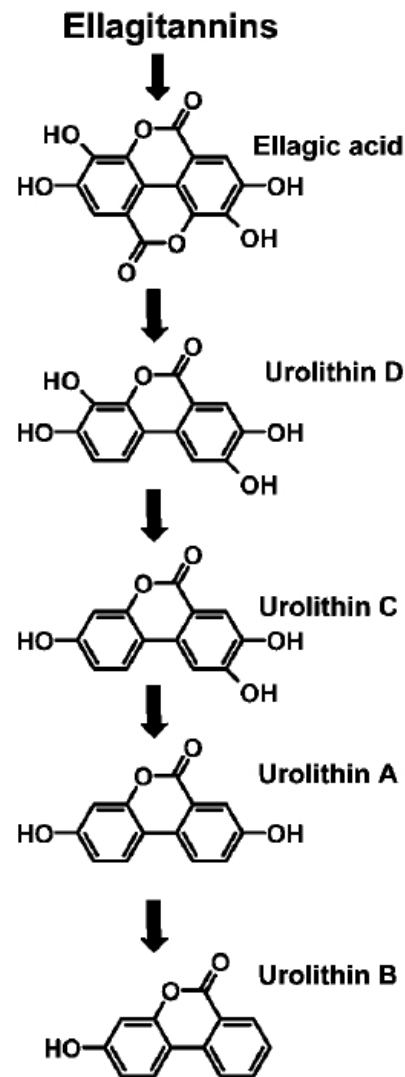


Abbildung 2: Metabolismus von Ellagitanninen zu Urolithinen über Ellagsäure (Espin et al., 2007)

Espin et.al. berichten in ihrer Studie über die Existenz starker interindividueller Schwankungen bei der Metabolisierung von Ellagitanninen, was zum Vorhandensein von *high* und *low urolithin excreters* führt. Im Verlauf der Studie an Iberischen Schweinen konnten starke individuelle Unterschiede in der Ausscheidung von Urolithinen bestätigt werden. (Espin et al., 2007)

1.1.5 Toxikologisches Profil

Einige Studien zeigten, dass Punicalagin, das vor allem in *Punica granatum* vorkommt, bei Rindern nephrotoxische Effekte und Lebernekrosen verursachen kann. Studien an Ratten zeigten, dass hohe Dosen dieses Ellagitannins zu schädlichen Auswirkungen führten, die im krassen Gegensatz zu den antioxidativen und hepatoprotektiven Effekten der Verbindung bei Acetaminophen-induzierten Leberschäden stehen. (Espin et al., 2007) Lin et.al. konnten diese Erkenntnisse hinsichtlich der toxischen Wirkung hoher Dosen Punicalagin während ihrer fünföchigen Untersuchungen nicht bestätigen. (Azorin-Ortuno et al., 2008)

Eine an gesunden, menschlichen Probanden durchgeführte Studie zeigte, dass die tägliche Einnahme von einer oder zwei Kapseln eines Extraktes aus Granatäpfeln (entsprechend 435 bzw. 870 mg Gallensäureäquivalenten) über 28 Tage keinerlei negative Auswirkungen hat. Auch allergische Reaktionen konnten nicht festgestellt werden. (Heber et al., 2007)

Auf Grund der Eigenschaft von Ellagitanninen, Bestandteile der Nahrung, wie Proteine, Cellulose, Pektin und Mineralstoffe zu binden und dadurch deren Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt entgegen zu wirken, sowie die Verdauungstätigkeit durch Komplexierung von Enzymen und endogenen Proteinen zu hemmen, stehen diese Verbindungen im Ruf, den Ernährungsstatus eines Individuums nachteilig zu beeinträchtigen. Toxische Effekte von, aus den Eichenarten *Quercus calliprinos*, *Quercus incana* und *Quercus coccifera* isolierten, Ellagitanninen konnten bei Rindern, Hasen und Ziegen festgestellt werden. Auch für die Inhaltsstoffe von *Quercus robur* existieren Berichte über toxische Effekte bei Rindern. Über einen Zeitraum von 96 Tagen durchgeführte Untersuchungen an Ratten mit Milchpulver, das mit Ellagitanninen aus Eichen angereichert wurde, zeigten keinerlei signifikante Beeinträchtigung von Serum-, hämatologischen und Gewebeparametern der Versuchstiere. Die milden Störungen führten die Autoren der Studie auf die proteinreiche Milchpulver-Ernährung der Ratten zurück und folgerten, dass die Einnahme von ellagitanninangereichertem Milchpulver auch für den Menschen keine gesundheitlichen Risiken darstellt. Dieser Umstand scheint besonders für

Weinliebhaber bedeutsam, da speziell Barrique-Weine reich an Ellagitanninen aus dem Holz von Eichenfässern sind. (Azorin-Ortuno et al., 2008)

1.1.6 Bedeutung der Ellagitannine

1.1.6.1 Bedeutung in der Lebensmitteltechnologie

Ellagitannine aus dem Holz verschiedener Eichenarten sind wesentlich an der Ausbildung des Geschmacks alkoholischer Getränke wie Wein und Whisky beteiligt. Während des Reifungsprozesses in geräucherten Holzfässern treten Substanzen aus dem Holz in die schwach saure Alkohol-Wasser-Mischung über und nehmen möglicherweise Einfluss auf Aussehen und geschmackliche Komponente des Gärungsproduktes. Der Vorgang des Räucherns der Eichenfässer wird als „Toasten“ bezeichnet und erfolgt durch Abflammen der innersten Holzschicht des Fasses wobei eine dünne Kohlschicht zurückbleibt. Während diesem Vorgang erfährt ein Großteil der im Eichenholz enthaltenen Ellagitannine eine thermische Umwandlung wodurch die adstringierende Geschmacksempfindung verringert wird. Nur ein geringer Teil der hydrolysierbaren Tannine verbleibt in seinem Ursprungszustand. (Quideau et al., 2005)

Untersuchungen zeigten, dass Castalagin und Vescalagin, die sich nur geringfügig hinsichtlich der Orientierung einer Hydroxylgruppe unterscheiden, durch thermische Behandlung zu Dehydro- sowie Deoxyderivaten umgewandelt werden. Zusätzlich kommt es zur Abspaltung von Ellagsäure aus den Ausgangsverbindungen. Deoxyvescalagin dient als Übergangsprodukt zu goldbraun-gefärbten, polymeren Verbindungen, die sich für die geschmackliche Komplexität und den Körper des Getränks verantwortlich zeigen. Vescalagin wirkt vierzehn Mal stärker adstringierend in seinen geschmacklichen Qualitäten als die resultierenden Polymere. Aus den Ellagitannin-Dimeren Roburin A und Roburin D werden Deoxy-Roburin A bzw. Dehydro-Roburin D gebildet. (Glabasnia und Hofmann, 2007)

1.1.6.2 Bedeutung aus medizinisch-pharmazeutischer Sicht

Ellagitannine werden überwiegend in traditionellen Medizinsystemen eingesetzt, wobei vor allem der asiatische Raum von Bedeutung ist. (Quideau et al., 2004)

In der konventionellen, westlichen Schulmedizin wurde ihr therapeutisches Potential bis dato stiefmütterlich behandelt. Dies liegt vor allem daran, dass Polyphenole, auf Grund ihrer proteinfällenden Eigenschaften der pharmazeutischen Industrie ein Dorn im Auge, üblicherweise zu Beginn von Standard-Extraktionsverfahren abgetrennt werden, um falsch-richtig Nachweisen während eines pharmakologischen Screenings vorzubeugen. (Quideau et al., 2005)

1.1.6.2.1 Effekte auf Herz und Blutkreislauf

Bereits 1960 wurden erste Untersuchungen hinsichtlich des Effekts von Ellagsäure auf Blutdruck und Blutgerinnung unternommen. (Espin et al., 2007)

Arteriosklerotische Veränderungen der Gefäßwände sind das Resultat verschiedener Faktoren bei denen vor allem die oxidierte Variante des LDL von Bedeutung ist. (Anderson et al., 2001)

Zahlreiche *in vitro* Studien haben gezeigt, dass pflanzliche Polyphenole, wie sie in gebräuchlichen Nahrungsmitteln wie Grünem Tee, Schokolade und Rotwein vorkommen, die Oxidation endogenen LDLs verhindern können und somit den Verlauf kardiovaskulärer Erkrankungen positiv beeinflussen können. Dieser Umstand wird auf das hohe antioxidative Potential der Polyphenole zurückgeführt. (Espin et al., 2007)

Walnüsse und deren Einfluss auf das Blutlipidprofil

Walnüsse können das menschliche Serumlipidprofil verbessern indem Gesamt- und LDL-Cholesterin sowie Triglyceride verringert, die Konzentration an HDL-Cholesterin und Apolipoprotein A1 hingegen erhöht wird. Ein Zusammenhang zwischen dem Verzehr von Walnüssen und einer Verringerung des Vorkommens ischämischer Herzerkrankungen ist ebenso experimentell belegt. Die polyphenolischen Verbindungen der Walnuß sind vor allem in dem braunen, den Kern umgebenden Häutchen, dem Pellikel, zu finden. Die phenolischen

Verbindungen fungieren als Schutz für die, im Nußkern enthaltenen, oxidationsempfindlichen Fettsäuren. Mehr als zehn verschiedene Vertreter mit phenolischer Struktur konnten im Pellikel nachgewiesen werden, wobei die hydrolysierbaren Tannine, genauer gesagt, die Ellagitannine, den Großteil dieser Substanzen ausmachen. Nachgewiesen werden konnte das Vorkommen von Ellagsäure, den Ellagitanninen Valonsäure-Dilakton und Pedunculagin sowie dreier weiterer, bis dato unbekannte Verbindungen, die von der Molekularmasse her zu den Ellagitanninen zu rechnen sind. *In vitro* Untersuchungen von Extrakten der Walnuß zeigten eine signifikant ausgeprägte Hemmung der kupfermediierten LDL-Oxidation gegenüber reiner Ellagsäure. Die Extrakte verhinderten ebenso die Oxidation von Plasma und LDL mittels 2,2'-Azobis(2-Amidinopropan)-Hydrochlorid, allerdings in einem geringeren Ausmaß als Ellagsäure. Die Fähigkeit, LDL- α -Tocopherol vor Oxidation zu schützen, ist bei reiner Ellagsäure und den Polyphenolen der Walnuß etwa gleich gut ausgebildet. Diese Erkenntnisse werden von einer kürzlich durchgeführten *in vivo* Studie bestätigt, die zeigte, dass der tägliche Verzehr von Walnüssen Gesamt- sowie LDL-Cholesterinspiegel signifikant reduziert, LDL- α -Tocopherolspiegel, sowie die Fähigkeit, *ex vivo* induzierten Oxidativen Stress zu widerstehen, aber nicht beeinflusst werden. (Anderson et al., 2001)

Auch Granatäpfel zeigen antioxidative Eigenschaften

Granatapfelsaft mit seinen bemerkenswerten antioxidativen Eigenschaften, die vermutlich auf das enthaltene Ellagitannin Punicalagin zurückzuführen sind, zeigte in zahlreichen Studien positive Einflüsse auf den Verlauf verschiedenster Herzkreislauferkrankungen. Zu diesen therapeutisch wertvollen Effekten zählen die Verringerung bestehenden Bluthochdrucks, die Reduktion von oxidativen Stress sowie die Verbesserung des Blutlipidprofils, allesamt Faktoren, die für die Entwicklung einer arteriosklerotischen Gefäßveränderung von Bedeutung sind. (Espin et al., 2007)

Die tägliche Einnahme von Granatapfelextrakt kapseln zeigte bei humanen Probanden eine signifikante Verringerung der TBARS, einem wesentlichen Biomarker für oxidativen Stress. (Heber et al., 2007)

Rotwein als Vasodilatator

Neben den Polyphenolen aus Walnüssen und Punicalagin aus dem Granatapfel konnte auch für den Konsum verschiedener Weinsorten ein Zusammenhang mit einem verminderten Risiko für die Entstehung ischämischer Herzerkrankungen ermittelt werden. Dieser kardioprotektive Effekt wird von anderen alkoholischen Getränken wie Bier oder Spirituosen nicht geteilt. Dieser Umstand mag auf das Fehlen antioxidativ-wirksamer Polyphenole in diesen Getränken zurückzuführen sein. Während *in vitro* Untersuchungen an, mittels Phenylephrin konstringierten, Aortenringen von Ratten zeigten in Barrique-Rotweine eine ausgeprägte endothel-abhängige Vasodilatation. Der Effekt konnte mittels Stickstoffmonoxid-Synthase-Hemmern aufgehoben werden, was auf eine Beteiligung von Stickstoffmonoxid an der Vasodilatation schließen lässt. Im Gegensatz zu Rotweinsorten aus Eichenfässern zeigten in Stahlfässern gelagerte Rotweine, neben sämtlichen Weißweinen der Versuchsreihe, keinerlei dilatierende Effekte an den Aortenringen. Dieser Umstand widerspricht den Erkenntnissen der Gruppe um Fitzpatrick, die während ihrer Versuche eine schwache Vasodilatation bei einem von zwei Weißweinen feststellten. Als Bindeglied zwischen barrique- und nicht-barrique-Weinen präsentiert sich die Weinsorte *Beaujolais Primeur*, deren Reifung zwar in Stahlfässern, der Fermentierungsprozess aber unter Anwesenheit der Traubenschalen und Stiele abläuft. Diese Weinsorte führte an der Rattenaorta zu einer Dilatation, aber in geringerem Ausmaße als unter Behandlung mit barrique-Weinen. Beim Einsatz an humanen, präkonstringierten Koronargefäßen zeigte sich ein vergleichbares Bild, wobei die Dilatation wiederum von der Funktionsfähigkeit des Endothels abhing. Der Einsatz von Tanninsäure, als repräsentative, phenolische Verbindung zu Kontrollzwecken zeigte ebenso eine Endothel-abhängige Vasodilatation an der Rattenaorta. Ebenfalls getestetes Quercetin lieferte eine Endothel-unabhängige Relaxation der Gefäßmuskulatur. Unter Behandlung mit Tanninsäure, Quercetin und Barrique-Rotweinen kam es zu einem vier bis zehnfachen Anstieg an cGMP, wobei Rotwein die stärksten Auswirkungen zeigte. Da der Alkoholgehalt des Weins als wirksame Substanz ausgeschlossen werden konnte, gingen Flesch et al. davon aus, dass natürliche Verbindungen aus den Weinreben und chemische Vorgänge während des

Fermentationsvorgangs für die vasodilatierenden Eigenschaften der Rotweine verantwortlich sein müssen. Gemäß den Erkenntnissen der Studie haben in Barriquefässern hergestellte Rotweine bei *in vivo* erreichbaren Konzentrationen einen vasodilatierenden Effekt und können somit den koronaren Blutfluss positiv beeinflussen. (Flesch et al., 1998)

1.1.6.2.2 Antivirale Eigenschaften

Ellagitannine zeigen antivirale Wirkungen gegenüber HI-, Leukämie- sowie Herpes-Simplex-Typ I und II Viren (HSV). Hemmende Effekte auf Herpes-Viren wurden bei den *wild-type* Stämmen Victoria und BJA nachgewiesen, wobei die eingesetzten Ellagitannine bei Konzentrationen im nano- und picomolaren Bereich Wirkung zeigten. Vescalagin, mit einer Wirksamkeit im subfemtomolaren Bereich, war bei empfindlichen Herpes simplex Stämmen am effektivsten. Die Wirkung des Dimers Roburin D ist vergleichbar mit der des Goldstandards Acyclovir. Weiters wurde die Effektivität von Ellagitanninen bei HSV-Stämmen mit bekannter Resistenz gegenüber Acyclovir dokumentiert. Ellagitannine zeigten in diesem Fall durchwegs 1×10^4 bis 1×10^5 mal höhere Aktivität als Acyclovir. Wiederum besticht Vescalagin durch seine hervorragende Wirkung. Im Gegensatz dazu liegt die Wirksamkeit des Epimers Grandinin sowie des Dimers Roburin D zurück. Eventuell ist aus diesem Umstand abzuleiten, dass die Orientierung der Hydroxylgruppe am C-1 des Zuckers wesentlichen Einfluss auf die Interaktion mit zellulären und viralen Strukturen besitzt. Weitere Faktoren, die für die Aktivität der Substanzen gegenüber HSV maßgeblich scheinen sind die Anwesenheit von Hexahydroxybiphenyl-Bausteinen sowie die Gesamtzahl phenolischer Gruppen im Molekül. Die HHDP- sowie NHTP-Einheiten sind anscheinend wesentlich an der Interaktion mit viralen Zielproteinen und Nukleotid-Helices beteiligt. Da die Wirksamkeit auch nach erfolgtem Virus-Attachment und Eindringen in die Wirtszelle festgestellt werden kann, scheinen intrazelluläre Vorgänge am Wirkmechanismus beteiligt. (Quideau et al., 2004)

1.1.6.2.3 Beeinflussung des Zellwachstums

Ellagitannine zeichnen sich durch antioxidative, antiproliferative sowie proapoptotische Eigenschaften aus und üben dadurch Einfluss auf den Zyklus von Zellen aus. (Fridrich et al., 2008)

Wirkung auf den Epidermal Growth Factor Rezeptor

Durch Wirkung auf den *Epidermal Growth Factor* Rezeptor beeinflussen Ellagitannine die Regulation des Zellzyklus und somit das Wachstum von Zellen. Diese Eigenschaft ist vor allem für die Prävention und Therapie des Kolon-Karzinoms von Bedeutung. Die Wirkung auf den *EGFR* konnte an Zellen der HT29 Zelllinie nachgewiesen werden. Nach einer Behandlungsdauer von 72 Stunden führten die Ellagitannine Castalagin, Vescalagin, Grandinin sowie Roburin E bei Konzentrationen im mikromolaren Bereich zu einer signifikanten Hemmung des Zellwachstums. Castalagin zeigte hierbei den stärksten hemmenden Effekt. Reine Ellagsäure zeigte ebenso inhibierende Eigenschaften, aber in geringerem Ausmaß als Ellagitannine. Eine Hemmung der Protein-Tyrosinkinase-Aktivität am isolierten *EGFR* konnte ebenso festgestellt werden, wobei Ellagitannine und Ellagsäure gleichermaßen im nanomolaren Bereich wirksam waren. Auch bei intakten HT29 Zellen konnte eine Reduktion der *EGFR* Autophosphorylierung gezeigt werden. Grandinin und Vescalagin waren hier beide in mikromolaren Konzentrationen wirksam. Der Konzentrationsunterschied zwischen der Wirkung auf den isolierten Rezeptor und dem *EGFR* intakter Zellen mag durch das hohe Molekulargewicht der Ellagitannine begründet sein, da dieses die Aufnahme in die Zelle beschränkt. (Fridrich et al., 2008)

Hemmwirkungen auf die Topoisomerase II

Vescalagin, Castalagin, Grandinin, Roburin E sowie Acutissimin A zeigten in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1 μM eine selektive, antiproliferative Aktivität gegenüber den Zellen einer Melanomzelllinie. Das 1-O-Galloyl-Derivat des Castalagin war bei einer ED_{50} von 11 μM in der Lage Apoptose in humanen Leukämie-Zellen zu induzieren. Eine weitere Studie an Mäusen zeigte, dass Acutissimin B eine starke, protektive Wirkung bei alkoholinduzierten Läsionen

im Bereich des Magen-Darm-Traktes aufweist. Einige C-Glykosid-Ellagitannine mit NHTP-Gruppen zeigten überdies eine hemmende Wirkung auf Topoisomerase II Enzyme des Menschen und erscheinen deshalb als mögliche Kandidaten zur Therapie zahlreicher Krebsformen. Eine Hemmung dieser Enzyme kann entweder, wie z.B. bei den Arzneistoffen Doxorubicin und Etoposid, durch eine Stabilisierung des kovalenten Topoisomerase-II-DNA-Komplexes und daraus resultierenden Bruch des Doppelstranges zu Stande kommen, oder durch den Einsatz katalytisch-wirksamer Hemmstoffe, die die Bindung der DNA an die Topoisomerase verhindern. Dies geschieht entweder über Stabilisierung nichtkovalenter DNA-Enzym-Komplexe oder durch Verhinderung der ATP-Bindung. Vescalagin, Castalagin und Acutissimin A wirken vermutlich als katalytische Hemmstoffe und zeigen bei *in vitro* Untersuchungen eine 100- bis 250-fach stärkere Hemmwirkung als Etoposid. Quideau et al. waren in der Lage die potentielle Topoisomerase-II-Hemmwirkung dieser Ellagitannine zu bestätigen und weitere, *in vitro* wirksame Vertreter aufzuzeigen. Dies waren, neben den schon genannten C-Glykosid-Ellagitanninen, Acutissimin B, die Epimere von Acutissimin A und B, β -1-O-Ethylvescalagin, Vescalen, Castalagin, Vescalagin, Castalin sowie Vescalin. Viele der Substanzen zeigten bei Konzentrationen von 1 μ M und 10 μ M eine weitaus höhere Aktivität als Etoposid, das in diesem Konzentrationsbereich eher schwach wirksam ist. Vescalin und Vescalen bewirken bei einer Konzentration von 10 μ M eine vollständige Hemmung der Topoisomerase II. Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen den bekannten katalytischen Hemmstoffen und den Verbindungen aus Quideaus Testreihe scheint auch für diese ein katalytischer Wirkmechanismus als wahrscheinlich. (Quideau et al., 2005)

Die tumorhemmenden Eigenschaften des Granatapfels

Der Saft von *Punica Granatum* steht im Ruf, antiproliferative, proapoptotische sowie antiangiogene Wirkungen auf Prostata- und Dickdarmkrebszellen zu haben. *In vitro* Studien belegen die Wirkung von Ellagitanninen auf Zellen dieser Krebsformen, wobei vor allem Punicalagin als aktivste Substanz zu nennen ist. Da aber eine Kombination aus mehreren Ellagitanninen wirksamer scheint als die

Einzelsubstanz, ist eine unterstützende Rolle der anderen Ellagitannine nicht auszuschließen. Allerdings sind diese Erkenntnisse mit Vorsicht zu bewerten, da nach Einnahme von Granatapfelsaft keines der Ellagitannine in seiner ursprünglichen Form, sondern nur Ellagsäure und Urolithine im Blut nachgewiesen werden können. (Heber, 2008)

Urolithine und Ellagsäure hemmen das Wachstum androgen-abhängiger und androgen-unabhängiger Prostatakarzinom-Zellen. Allerdings tritt diese Hemmwirkung bei Urolithinen schon bei geringeren Konzentrationen als bei Ellagsäure auf (LNCaP-Zellen: $31,3 \pm 0,5 \mu\text{mol/L}$ vs. $62,4 \pm 4,2 \mu\text{mol/L}$). Unter Berücksichtigung der geringen Bioverfügbarkeit von Polyphenolen ist allerdings zu bedenken, dass die *in vitro* wirksamen Konzentrationen *in vivo* nie erreicht werden können. (Seeram et al., 2007)

Die Hemmung der Proliferation erfolgt über eine Inhibierung des Zellzyklus der Prostatakrebszellen, Stimulation von Apoptose sowie über die Inaktivierung proinflammatorischer Signalkaskaden, wie zum Beispiel dem NF- κ B-Signaltransduktionsweg. Entzündungsreaktionen, wie sie durch NF- κ B, und in weiterer Folge Cyclooxygenase-2 mediiert, werden, sind häufige Begleiterscheinungen bei Prostatakrebs und anderen Krebsvarianten wie Dickdarm- und Brustkrebs. Der, durch die Entzündung hervorgerufene, oxidative Stress und die, dadurch bedingte, Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führen zur Entstehung physiologischer Zustände, die das Überleben der Krebszellen begünstigen. Deswegen gilt der nukleäre Transkriptionsfaktor NF- κ B als wichtiger Biomarker zur Einschätzung der Wahrscheinlichkeit des Wiederaufflammens einer Prostatakrebs-Erkrankung.

In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass ellagitanninreicher Granatapfelsaft die Proliferation humaner Prostatakrebszellen sowie humaner Nabelvenenendothelzellen unter normalen sowie hypoxischen Bedingungen hemmen kann. Die Konzentrationen an *Hypoxia-inducible-Factor-1 alpha* und *Vascular endothelial growth Factor*, beides wesentliche Faktoren der Angiogenese und somit der Vaskularisierung des Tumors, waren unter Einfluss von Granatapfelsaft bei hypoxischen Bedingungen ebenfalls deutlich verringert.

Die perorale Verabreichung ellagitanninreichen Granatapfelsafts über einen Zeitraum von vier Wochen an Mäuse, denen humane Prostatakrebszellen der LAPC4-Zelllinie injiziert worden waren, führte zu einer Hemmung des Tumorwachstums, einer Verringerung der Gefäßdichte und einer Reduktion der Expression von *HIF-1 alpha* und *VEGF*. Diese Ergebnisse liefern erste Hinweise, dass Ellagitannine des Granatapfelsaftes die Angiogenese von Tumoren hemmen können. (Heber, 2008)

Klinische Studien an Männern mit PSA-Werten mit steigender Tendenz, die sich zuvor schon einer Chemotherapie oder einen chirurgischen Eingriff unterzogen hatten, und über einen Zeitraum von vier Jahren täglich 240 ml Granatapfelsaft einnahmen, zeigten eine signifikante Verlängerung der Zeitspanne bis zur Verdoppelung des PSA-Wertes bei 85% aller Teilnehmer. Ein *ex vivo* mit Serum einiger Studienteilnehmer durchgeführter Bio-Assay zeigte nach zweijähriger täglicher Einnahme von Granatapfelsaft eine Hemmung der Proliferation sowie die Einleitung von Apoptose der Prostatakarzinomzellen. (Heber, 2008)

Der Einsatz reiner Ellagsäure bei Männern mit fortgeschrittenem Prostatakrebs zur Linderung der Nebenwirkungen einer Chemotherapie wurde von Falsaperla et al. untersucht. Die Gruppe berichtete von einer geringfügigen Verringerung der Nebenwirkungen der Chemotherapie (auffälligstes Ergebnis war die Verringerung des Neutropenie-Risikos) und fand keine Hinweise auf eine Verbesserung oder Verzögerung der Progression der Krankheit durch reine Ellagsäure. (Espin et al., 2007)

Beerenextrakte und Krebserkrankungen

Zahlreichen *in vitro* Studien bestätigten, dass die Extrakte verschiedener Beeren die Proliferation von Krebszellen hemmen können. Diese Eigenschaft wird den verschiedenen, antioxidativ-wirksamen Inhaltsstoffen der Beeren, etwa Vitamin C, Carotinoide, Xanthophylle und Polyphenole, zugeschrieben. Für einige Polyphenole, wie Anthocyane, Anthocyanidine und Ellagsäure wurde bereits ein Nachweis der antiproliferativen Wirksamkeit erbracht. Mit Hilfe eines, mit Polyphenolen angereicherten und von anderen antioxidativen Komponenten gereinigten Himbeerextraktes konnte bei *in vitro* Untersuchungen eine

dosisabhängige, antiproliferative Wirkung auf humane Gebärmutterhalskrebszellen nachgewiesen werden. Obwohl vorangegangene Studien auf die Bedeutung von Anthocyanen als wirksame Komponente hindeuteten, konnte kein Zusammenhang zwischen dem Anthocyangehalt und den antiproliferativen Eigenschaften des Extraktes festgestellt werden, sodass sich die Schlussfolgerung aufdrängt, dass andere Substanzen für die Hemmwirkung verantwortlich sind. Die ellagitanninreiche Fraktion des Extraktes zeigte wesentlich ausgeprägtere antioxidative Wirkung als der Gesamtextrakt oder der anthocyanhaltige Anteil. Eine andere Studie zeigte, dass dem wasserlöslichen Extrakt aus Himbeersamen, die besonders reich an Ellagitanninen sind, eine ausgeprägte antiproliferative Aktivität innewohnt. Bei einer Studie über die antimutagenen Eigenschaften von Erdbeerextrakten war ebenfalls die ellagitanninreiche Fraktion am wirkungsvollsten. Als antiproliferativ wirksamer Bestandteil des Extraktes wird die metabolisch freigesetzte Ellagsäure vermutet. (Ross et al., 2007)

Weiters zeigte die orale Gabe von ellagitanninreichen Nahrungsmitteln wie Erdbeeren oder Himbeeren an Ratten eine hemmende Wirkung auf Promotion sowie Progression chemisch induzierter Karzinome des Darms und des Oesophagus. Im Gegensatz zu den bisherigen antiproliferativen Erfahrungen mit Ellagitanninen stehen Erkenntnisse einer Forschungsgruppe um Paivarinta, die keine positiven Effekte nach der Verabreichung reiner Ellagsäure (1,5 g/kg Körpergewicht) oder Extrakten aus *Rubus chamaemorus* an Mäuse, die eine Mutation des APC-Gens aufwiesen und Adenome im Dünndarm trugen, feststellen konnten. Eventuell lässt sich aus diesem Ergebnis schließen, dass die antitumoralen Eigenschaften der Ellagsäure sowie verwandter Moleküle vom Typus der vorliegenden Krebserkrankung abhängen. (Espin et al., 2007)

1.1.6.2.4 Knochenspezifische Effekte

Park et al. zeigten in ihrer Studie hinsichtlich der Wirkung des, aus *Euphorbia helioscopia* isolierten, Ellagitannins Furosin eine hemmende Wirkung auf Entwicklung und Resorptionsfähigkeit von verschiedenen osteoklastären Entwicklungsstufen. Die eingesetzten Osteoklasten wurden entweder aus murinen

Knochenmarkszellen stimuliert mit RANKL und M-CSF oder aus Zellen der RAW 264.7 Zelllinie unter Zusatz von RANKL kultiviert. 10 µg/ml Furosin zeigte bei Osteoklasten aus Knochenmarkszellen eine Verringerung der TRAP-Aktivität auf etwa 20% der Kontrollgruppe, weshalb diese Konzentration für alle weiteren Untersuchungen verwendet wurde. Auch bei Osteoklasten aus RAW-Zellen führte Furosin zu einer Verringerung der Zahl mehrkerniger TRAP-positiver Zellen sowie einer Reduktion der TRAP-Aktivität adulter Zellen. Dieser Umstand ist nicht auf eine generelle zytotoxische Wirkung der Verbindung zurückzuführen, wie Untersuchungen mit der vierfachen Konzentration an Furosin belegen.

Durch Zusatz von Furosin zu den Knochenmarkszellen zusammen mit RANKL und M-CSF am Tag 0 der Kultur konnte die Osteoklastenbildung vollständig verhindert werden. Furosin-Zusatz am Tag 1 verringerte die Anzahl TRAP-positiver Zellen und hemmte die TRAP-Aktivität teilweise. Ab dem zweiten Tag liegt der Großteil der Zellen bereits als mehrkernige, TRAP-positive Osteoklasten vor, weshalb Furosin keinen Effekt mehr zeigte. Neben der Hemmung der Osteoklastogenese konnten Park et al. auch eine Verringerung der Resorptionstätigkeit bestehender Osteoklasten durch Furosin nachweisen. In Abhängigkeit zur eingesetzten Dosis an Furosin kam es zu eingeschränkter Bildung von Resorptionsarealen, vermutlich zurückzuführen auf die Hemmung der Aktinring-Synthese durch das Ellagitannin. Park et al. vermuten die Hemmung der Aktinring-Bildung sowie die Verhinderung der RANKL-induzierten Phosphorylierung von p38 MAP-Kinase und JNK/AP-1 Signalkaskaden als hauptsächliche Wirkungsmechanismen an. Außerdem kamen sie zu der Erkenntnis, dass, neben der hemmenden Wirkung auf die p38 MAPK und JNK, auch die Phosphorylierung von ERK, einem Regulator der Osteoklasten-Differenzierung, teilweise verhindert wird. Auf Grund der ERK-Hemmung ist eine Wirkung auf osteoklastäre Mikrostrukturen, wie die, zu Resorptionszwecken unabdingbare *Ruffled Border* nicht auszuschließen. Wegen der ausgeprägten antioxidativen Eigenschaften von Ellagitanninen, sowie dem bekannten Einfluss reaktiver Superoxidradikale auf Knochenresorption und Osteoklastogenese ist eine Beteiligung antioxidativer Mechanismen an der

Wirkung wahrscheinlich. Im Gegensatz zu Berichten, die von einer Quercetin-induzierten Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und AP-1 sprechen, konnte diese Wirkung bei der Behandlung mit Furosin nicht festgestellt werden. (Park et al., 2004)

Abhilfe bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises

Wie Shukla et al. feststellten, besitzen die in Granatapfelsaft enthaltenen Ellagitannine eine protektive Wirkung gegenüber entzündlichen Knochen- und Gelenksercheinungen. Die Gruppe kam zu der Erkenntnis, dass die enthaltenen Polyphenole in der Lage waren, Verlauf sowie Schwere des Krankheitsbildes künstlicher, kollagen-induzierter Arthritis bei Mäusen zu verlangsamen und zu verbessern. Das Eindringen von Entzündungszellen in die Gelenke sowie die damit verbundene Zerstörung von Knochen und Knorpel konnte gemildert werden. Die Spiegel des Entzündungsfaktors Interleukin-6 in den Gelenken der Mäuse waren unter Therapie mit Granatapfelsaft signifikant geringer als bei der Vergleichsgruppe. (Shukla et al., 2008)

1.1.7 Ellagitannin-Dimere und Knochenmetabolismus

Wie vorangegangene Untersuchungen mit pflanzlichen Polyphenolen (Park et al., 2004; Trzeciakiewicz et al., 2009; Yun et al., 2007) gezeigt haben, sind diese Verbindungen in der Lage den Knochenmetabolismus zu beeinflussen. Auf Grund dieser Erkenntnisse und der Möglichkeit über die Groupe Polyphénols hochreine Ellagitannine zu beziehen, befassten wir uns in mehreren Testreihen mit den Auswirkungen verschiedener hydrolysierbarer Tannine auf den Knochenabbau durch Osteoklasten. Nachdem bereits für einige NHTP-Gruppen tragende Ellagitannine eine Hemmung der Osteoklastentätigkeit nachgewiesen werden konnte (Ergebnisse nicht publiziert), beschäftigten wir uns in weiterer Folge mit der Untersuchung der Einflüsse der Ellagitannin-Dimere Roburin A und Roburin D auf die Funktionalität von Knochenzellen, im besonderen der Osteoklasten.

1.2. Knochen und Knochenzellen

1.2.1 Das menschliche Skelett

Das Skelett des Menschen besteht aus 213 Knochen, wobei zwei verschiedene Formen von Knochen unterschieden werden. Dies sind zum einen flache Knochen, die zum Beispiel den Schädel, das Unterkiefer und die Schulterblätter bilden. Zum anderen finden sich Röhrenknochen, die Oberschenkel, Schienbein und die Speiche des Unterarms bilden. Röhrenknochen werden durch eine Kombination von endochondraler und membranöser Knochenbildung gebildet. Flache Knochen entstehen alleine als Resultat von Vorgängen während der membranösen Knochenbildung. (Dempster, 2006)

1.2.2 Die Anatomie des Knochens

Röhrenknochen bestehen aus einem hohlen Schaft, der sich an beiden Enden konisch erweitert und in der Metaphyse endet. Eine Wachstumsplatte genannter, Abschnitt trennt die Metaphyse von der darüber liegenden Epiphyse. Der Schaft besteht vorwiegend aus kortikalem Knochen, im Gegensatz dazu bestehen Meta- und Epiphyse vor allem aus spongiösem Knochen, der von einer Schicht kortikalem Knochen umgeben ist. Der überwiegende Teil des menschlichen Skeletts wird von kortikalen Knochen gebildet. Nur ein geringer Anteil von 20 % ist spongiösen Ursprungs. Allerdings unterscheidet sich das Verhältnis von kortikalem zu spongiösem Knochen stark nach der Lokalisation des Knochens im Körper.

Kortikaler Knochen erscheint makroskopisch betrachtet sehr dicht und fest. Im Gegensatz dazu scheint spongiöser Knochen aus einem bienenwabenartigen Gitter aus trabekulären Platten und Stäben zu bestehen. Trotzdem werden beide Knochenarten aus der gleichen Basiseinheit, dem Osteon, aufgebaut.

Röhrenknochen werden von einer fibrösen Schicht, dem Periosteum, umschlossen. Im hohlen Innenraum, das Knochenmark begrenzend, liegt eine zweite membranöse Haut, das Endosteum, dem Knochen an. Beide Schichten umfassen neben Nervenendigungen, Osteoblasten und Osteoklasten die zur

Ernährung des Knochens notwendigen Blutgefäße. Das Periosteum, das mittels Shapeys-Fasern aus Kollagen am Knochen verankert ist, umschließt den gesamten Knochen mit Ausnahme der Gelenksareale, die stattdessen Gelenksknorpel aufweisen. Das Endosteum fungiert als äußere Hülle flacher Knochen und kleidet Volkmans Kanäle, durch den Knochen verlaufende Blutgefäßkanäle, aus. (Dempster, 2006)

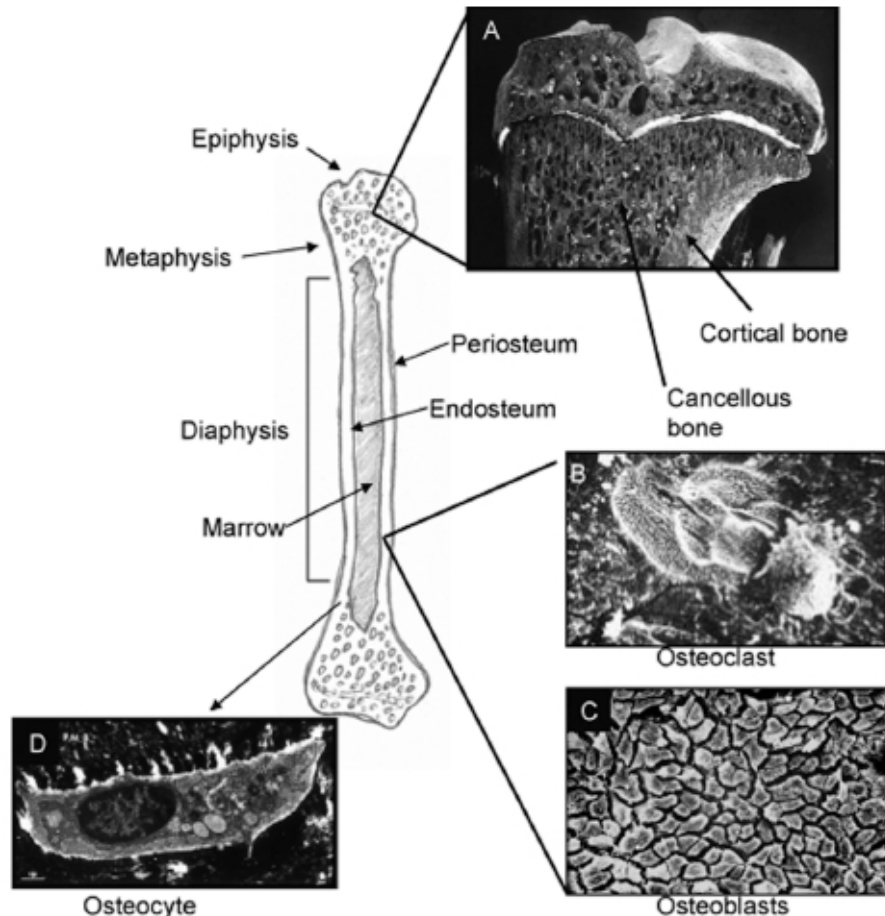


Abbildung 3: Der Aufbau eines Röhrenknochens. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme der Wachstumsplatte des Schienbeins der Ratte. (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines humanen Osteoklasten nach 24 Stunden Kultur auf einem Knochenplättchen. (C) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Osteoblasten an der Oberfläche eines Röhrenknochens der Ratte. (D) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Osteozyten der Ratte. (Dempster, 2006)

Organische Matrix und Knochenmineralien

Knochen bestehen aus organischer Matrix in Verbindung mit einem mineralischen Anteil. Verleiht die organische Matrix dem Knochen seine Flexibilität und Elastizität, so stammen Belastbarkeit und mechanische Festigkeit von den eingelagerten Hydroxylapatitkristallen. Der Mineralanteil an den Knochen erwachsener Säugetiere liegt zwischen 50 und 70 %. Neben dem mineralischen Anteil bestehen Knochen aus 5-10 % Wasser sowie einem Lipidanteil unter 3 %. Die genaue Zusammensetzung ist, unter anderem, abhängig vom Alter des Individuums, der Lokalisation des Knochens im Körper sowie dem Ernährungs- und Gesundheitszustand. Die am Knochenaufbau beteiligten Mineralien sind Analoga des geologischen Hydroxylapatits. Allerdings sind die Hydroxylapatitkristalle des Knochens sehr viel kleiner als die geologisch verbreiteten Formen und weisen zahlreiche Verunreinigungen durch Fremdionen auf. Ebenso fehlen bei diesen Knochenkristallen im Gegensatz zum geologischen Äquivalent einige Hydroxylgruppen. Der physiologische, schlecht-kristalline, carbonat-substituierte Apatit ist wesentlich besser löslich als die geologischen Kristalle und kann somit als Speicher für Kalzium-, Phosphat- und Magnesium-Ionen dienen.

20-40 % der Knochenmasse bildet die organische Knochematrix. Sie besteht aus Kollagen und Proteinen nichtkollagener Natur. Das am Knochenaufbau verwendete Kollagen Typ 1 ist ein tripel-helikales Molekül, das sich aus zwei $\alpha 1$ - und einer, strukturell sehr ähnlichen aber genetisch unterschiedlichen, $\alpha 2$ -Kette zusammensetzt. α -Kollagenfasern zeichnen sich durch die Wiederholung der Aminosäuresequenz Glycin-Prolin-Hydroxyprolin, wobei Prolin manchmal auch gegen andere Aminosäuren substituiert werden kann, und verschiedene posttranslationale Modifikationen aus. Die einzelnen Kollagenmoleküle bauen ein Netzwerk aus Fasern auf, das die organische Matrix bildet. Nichtkollagene Proteine machen zwischen 10 und 15 % der Gesamtknochenmasse aus, wobei etwa ein Viertel dieser Proteine aus exogenen Quellen stammt. Den überwiegenden Teil dieser Verbindungen stellen Proteine des Serums wie Albumin oder α_2 -HS-Glykoprotein, die auf Grund ihres sauren Charakters an das Hydroxylapatit des Knochens binden. Den Rest der NCPs mit exogenem

Ursprung stellen verschiedene Wachstumsfaktoren. Prinzipiell umfassen die NCPs vier Gruppen, die sich teilweise überschneiden. (Robey und Boskey, 2006)

- Proteoglykane : Makromoleküle aus einem zentralen Protein mit sauren Polysaccharidseitenketten. Darunter fallen Versican und Hyaluronan, die zur Gruppe der *small leucine-rich Proteoglykane* zählen und vor allem während der initialen Schritte der Knochenbildung expremiert werden. Im Verlauf der Ossifikation wird Versican durch die Chondroitinsulfat-Proteoglykane Decorin und Biglykan ersetzt. Diese spielen vermutlich eine bedeutende Rolle beim Aufbau der meisten Gewebsarten sowie der Knochen. (Robey und Boskey, 2006)
- Glykosilierte Proteine: Hierzu zählt das wichtige Enzym alkalische Phosphatase, das über Phosphoinositol-Brücken an die Zelloberfläche gebunden vorliegt und vermutlich wesentlich an den Mineralisationsvorgängen am Knochen beteiligt ist. Ebenso wird Osteonectin, das etwa 2 % aller NCPs des Knochens während der Entwicklung ausmacht, zu dieser Gruppe gerechnet. Die Funktionen von Osteonectin sind zahlreich und umfassen vermutlich Einflüsse auf die Osteoblastenentwicklung und –proliferation sowie die Mineralisierung der Matrix. (Robey und Boskey, 2006)
- Glykosilierte Proteine mit dem Potential zur Anhaftung an Zellen: Unter diese Kategorie fallen all jene Proteine, die an Zellen binden können. Zahlreiche Verbindungen dieser Gruppe liegen phosphoryliert oder sulfatiert vor und enthalten die Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD-Sequenz), die über Integrine an der Oberfläche zahlreicher Zellen eine Bindung herstellen kann. Allerdings ist ebenso eine RGD-unabhängige Bindung möglich. Zu dieser Gruppe von Proteinen zählen Osteopontin sowie *Bone Sialoprotein*, die zur Verankerung von Osteoblasten am Knochen dienen und außerdem eine hohe Affinität zu Kalzium-Ionen zeigen. (Robey und Boskey, 2006)

- γ -carboxylierte Proteine : Vertreter dieser Gruppe sind das Matrix γ -Carboxylsäure-Protein, das in zahlreichen Bindegewebsarten vorkommt, Protein S sowie das, in Dentin und Knochen exklusiv vertretene, Osteocalcin, das als wesentlicher Marker des Knochenumbaus beim Menschen vor allem in Osteozyten vorkommt. (Robey und Boskey, 2006)

Proteoglykane	Glykosilierte Proteine	Glykosilierte Proteine mit Potential zur Anhaftung an Zellen	γ -carboxylierte Proteine
▣ Aggrecan ▣ Versican ▣ Decorin ▣ Biglykan ▣ Asporin ▣ Fibromodulin ▣ Osteoadherin/ Osteomodulin ▣ Lumican ▣ Osteoglycin/ mimecan ▣ Hyaluronan	▣ Alkalische Phosphatase ▣ Osteonectin ▣ Tetranectin ▣ Tenascin-C ▣ Tenascin-W	▣ Osteopontin ▣ Bone Sialoprotein ▣ DMP-1 ▣ MEPE ▣ DSPP ▣ Thrombospondine ▣ Fibronectin ▣ Vitronectin ▣ Fibrillin 1 und 2	▣ Matrix Gla Protein ▣ Osteocalcin ▣ Protein S

Tabelle 1: Tabelle der bekannten Vertreter der Nicht-kollagenen Proteine in der organischen Knochenmatrix (Robey und Boskey, 2006)

1.2.3 Die Funktionen des Knochens

Der Knochen erfüllt im Körper mechanische sowie metabolische Aufgaben. Allgemein wird angenommen, dass spongöser Knochen metabolisch aktiver ist als die kortikale Form. Allerdings scheinen spezies- und situationsbedingte Unterschiede in dieser Hinsicht zu bestehen. Röhrenknochen und flache Knochen erfüllen gleichermaßen mechanische Aufgaben, wobei Röhrenknochen als Hebelpunkte für Muskeln dienen und somit an jeder Form von Bewegung

beteiligt sind. Flache Knochen erfüllen eine Schutzfunktion für darunterliegende Organe. Die metabolischen Funktionen umfassen Speicherung und Freisetzung von Kalzium, sowie die regulatorische Beeinflussung des Säure-Basen-Haushaltes. Weiters dienen Knochen und Knochenzellen als reichhaltige Quelle von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die einen Einfluss auf hämatopoetische Stammzellen ausüben. (Dempster, 2006)

1.2.4 Knochenmodeling und –remodeling

Um seine Aufgaben auch auf Dauer erfüllen zu können, ist ein dynamisches Prinzip des Knochens unumgänglich. Darunter fallen einerseits das Knochenmodeling, andererseits das Knochenremodeling. Während beider Vorgänge ändert sich die Form eines Knochens in Folge osteoblastärer und osteoklastärer Funktion, wobei sich das Modeling vom Remodeling durch das Fehlen vorangegangener Resorptionsaktivitäten am Knochen unterscheidet. Knochenmodeling tritt hauptsächlich während des Wachstums sowie zur Anpassung des Knochens an mechanische Belastungen auf. Üblicherweise tritt Knochenmodeling weitaus seltener auf, als Knochenremodeling, kann aber unter verschiedenen pathologischen Zuständen, wie etwa Nierenerkrankungen und Hypoparathyroidismus, verstärkt in Erscheinung treten. Auch knochenanabolische Substanzen, wie Teriparatid, können Einfluss auf das Knochenmodeling ausüben. (Dempster, 2006)

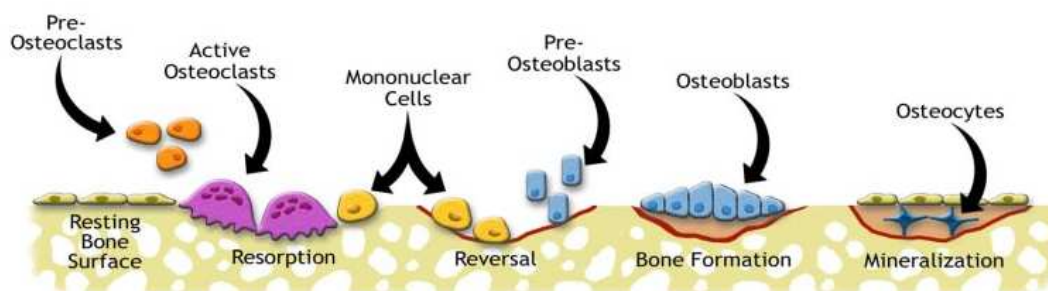


Abbildung 004: Die Phasen des Bone Remodelling. (Arbor, 2005)

Remodeling des Knochens

Knochenremodeling dient zur Reparatur belastungsbedingter Mikrofrakturen, die in Folge mechanischer Belastung entstehen und durch Akkumulation auf Dauer die strukturelle Integrität des Knochens nachteilig beeinflussen könnten. Die zweite wesentliche Funktion des Remodelings besteht in der Aufrechterhaltung der Kalzium- und Phosphat-Homöostase des Körpers.

Knochenremodeling ist ein vierphasiger Prozess, der unter Beteiligung einer Gruppe von Zellen, der *Bone Remodeling Unit*, abläuft. (Dempster, 2006)

1. *Activation*: Umfasst die Umwandlung des ruhenden Knochens in einen Knochen unter aktivem Umbau. Dieser Vorgang erfordert die Bereitstellung mononukleärer Osteoklastenvorläuferzellen, deren Penetration durch die Zellschicht am Knochen und die Fusion zu mehrkernigen Osteoklasten. (Dempster, 2006)

2. *Resorption*: Osteoklasten binden über Reaktion von Integrinrezeptoren der Osteoklastenoberfläche mit RGD-Peptidsequenzen der Knochenmatrix an den Knochen und bilden eine *Sealing Zone* aus, die das *Bone-Resorbing-Compartment* umschließt. Durch Absenken des pH-Wertes und Einsatz lysosomaler Enzyme wird die mineralische und organische Knochenmatrix abgebaut und daher Kalzium, Phosphat und Botenstoffe freigesetzt. Zurück bleiben rundliche Resorptionsstellen, sogenannte Howship'sche Lakunen. Der Prozess endet mit der Apoptose der Osteoklasten. (Dempster, 2006)

3. *Reversal*: Mononukleäre Zellen, darunter Monozyten, Osteozyten und Präosteoblasten wandern in die Howship'shen Lakunen ein. Osteoblasten, die durch chemische Botenstoffe angezogen werden, wandern ebenso in die Lakunen. Der genaue Mechanismus, der die Osteoblasten an den Resorptionsort zieht, ist nicht geklärt, allerdings geht man davon aus, dass während der osteoklastären Resorption Wachstumsfaktoren (TGF- β , IGF-1 und 2, *bone morphogenic proteins*,

platelet derived growth factors und *fibroblast growth factors*) aus dem Knochen freigesetzt werden, die als chemotaktische Botenstoffe fungieren. Ein anderer Erklärungsansatz bietet sich in der *Strain-Theorie*. Diese besagt, dass Osteoklasten während der Resorption des Knochens die Spannung innerhalb des Knochens erhöhen, was wiederum zur Aktivierung von Osteoblasten führt. Eventuell spielen auch die Osteoklasten selbst eine wesentliche Rolle bei der Anziehung der Osteoblasten. (Dempster, 2006)

4. *Formation*: Im Verlauf dieser Phase synthetisieren Osteoblasten die Knochenmatrix und mineralisieren diese in nachfolgenden Schritten. Zur Generierung eines zur Mineralisierung geeigneten Milieus setzen Osteoblasten Matrix-Vesikel ein. Diese bauen Inhibitoren des Mineralisierungsprozesses ab und erhöhen die Konzentration an Kalzium- sowie Phosphationen im Bereich der Knochenbildungsstelle. Im Verlauf der Bildung frischer Knochenmatrix werden einige Osteoblasten in der Matrix eingeschlossen und werden zu Osteozyten, die durch *Gap-Junctions* miteinander in Kontakt stehen und dadurch ein feingewobenes Netzwerk bilden, das Informationen über den Status des Knochens an Zellen an der Knochenoberfläche übermitteln kann. Nach Abschluss der *Formation-Phase* bleiben einige Osteoblasten als *Bone-Lining-Cells* an der Knochenoberfläche zurück, der überwiegende Teil der Osteoblasten erleidet Apoptose (50-70 %). *Bone-Lining-Cells* dienen zur Regulation des Ionenstroms in und aus dem Knochen und zur Begrenzung von Arealen des Remodelings. Sie können zu einem späteren Zeitpunkt wieder zu funktionsfähigen Osteoblasten umgestaltet werden. (Dempster, 2006)

Der Endpunkt des Remodelings ist die Bildung eines neuen Osteons, das heißt frischer, unmineralisierter Knochenmatrix. Der Ablauf des Knochenremodelings ist in kortikalem und spongiösem Knochen der gleiche. Da auf Seiten des Endosteums die Bilanz der Knochenbildung negativ ist wächst die

Knochenmarkshöhle während des Skelettwachstums stetig. Ähnlich verhält sich die Situation an den flachen Knochen. (Dempster, 2006)

1.2.5 Zelllinien mit wesentlichen Funktionen am Knochen

1.2.5.1 Vertreter der Osteoblasten-Zelllinie

Zu den Abkömmlingen der Osteoblasten-Zelllinie zählen Osteoprogenitor-Zellen, die am Erhalt der Osteoblasten-Population beteiligt sind, Osteoblasten, die die Knochematrix sezernieren und an der Mineralisierung der Knochenmatrix beteiligt sind, sowie Osteozyten, mit ihren mechano-sensorischen Eigenschaften, und *Bone-Lining-Cells*. (Aubin et al., 2006) Alle diese Zelltypen, ebenso wie Chondrozyten, Fibroblasten, Myozyten und Adipozyten, entwickeln sich aus mesenchymalen Knochenmarksstammzellen. Die Entwicklung der verschiedenen Zelltypen aus den Stammzellen verläuft unabhängig voneinander. Allerdings können ausdifferenzierte Zellen bei Bedarf nachträglich in andere Zellarten mit mesenchymalen Stammzellen als Ursprung umgewandelt werden. (Zaidi, 2007)

Die Bildung neuer Osteoblasten

Der erste Schritt zur Generierung frischer Osteoblasten aus Stammzellen ist die Entwicklung von Osteoprogenitor-Zellen. Dieser Vorgang ist durch die Ausbildung einer großen Menge an Hormon- und Zytokinrezeptoren gekennzeichnet. Es werden vor allem Rezeptoren für Parathormon, Prostaglandine, Interleukin-11, IGF-1 sowie TGF- β gebildet. Die wesentlichen Regulatoren der frühen Entwicklungsphase sind Wingless-Ints sowie *Bone morphogenetic proteins*. Maßgeblich für die Proliferation der Zellen sind Twist und Id, zwei helix-loop-helix-Proteine. (Zaidi, 2007)

Die Reifung funktionsfähiger Osteoblasten aus Stammzellen, und somit als Konsequenz die Bildung frischen Knochens, wird vor allem durch drei Faktoren geregelt. Dies ist zum einen Runx2, der über eine negative Beeinflussung des Transkriptionsfaktors Twist wirkt. Die Aktivierung von Runx2 erfolgt über verschiedene Mechanismen wie die Phosphorylierung von Smad durch BMPs und TGF- β , oder die direkte Phosphorylierung von Runx2 durch Parathormon und

Fibroblast Growth Factor. Aktivierter Runx2 bindet, zusammen mit seinem Partner *Core binding factor $\beta 1$* an die DNA und bildet in abgeschlossenen Kernkompartimenten Komplexe mit anderen Regulationsfaktoren. Runx2 ist ein wesentlicher Faktor für die Differenzierung zu vollwertigen Osteoblasten und erfüllt damit eine Schlüsselfunktion bei der endochondralen Knochenbildung. (Zaidi, 2007)

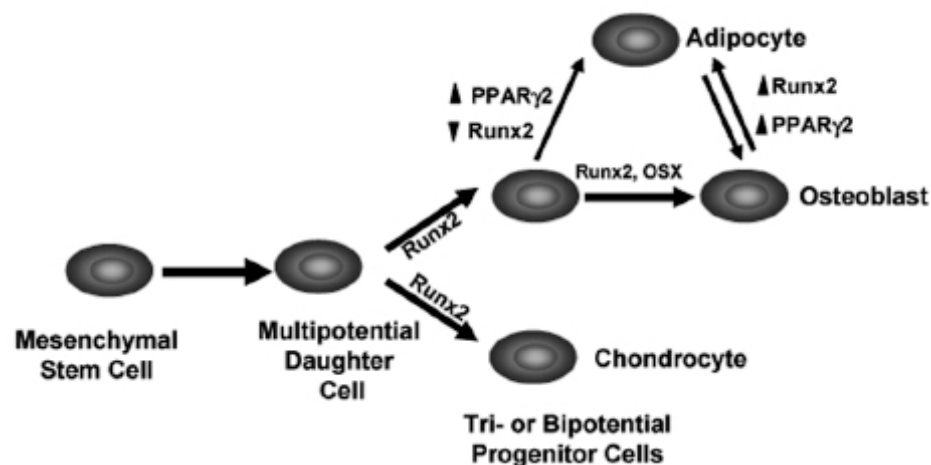


Abbildung 5: Die Entwicklung pluripotenter Stammzellen zu Zellen der mesenchymalen Stammzelllinie. Bemerkenswert ist, dass Adipozyten durch gewisse Faktoren (Runx2 etc.) in Osteoblasten umgewandelt werden können. (Aubin et al., 2006)

Der zweite wesentliche Faktor zur Ausdifferenzierung von Osteoblasten ist die Reaktion zwischen Osterix und NFAT. Osterix wird als Folge von BMP-2 und IGF-1 aktiviert. Es bindet die, durch Dephosphorylierung aktivierte, Variante von NFAT-2, wodurch die Bildung von Osteoblasten stimuliert wird.

Der letzte wesentliche Schritt zur Bildung von Osteoblasten besteht im Wnt- β -Catenin Signaltransduktionsweg, der sowohl für Knochenbildung als auch Umbau des Knochens wesentlich ist. Hierbei wird durch Bindung des *Low-density lipoprotein receptor-related protein 5* an den *frizzled receptor* Komplex die Phosphorylierung des β -Catenins durch die Glykogen Synthetase Kinase-3 β verhindert, wodurch β -Catenin gegenüber dem Abbau als Folge von Ubiquitinierung unempfindlich wird. Daraus resultieren die Akkumulation des Faktors und der Transport in den Zellkern. Im Kern tritt β -Catenin mit dem

Transkriptionsfaktor Tcf/Lef in Wechselwirkung, was schlussendlich zur Differenzierung der Zelle zum Osteoblasten führt. (Zaidi, 2007)

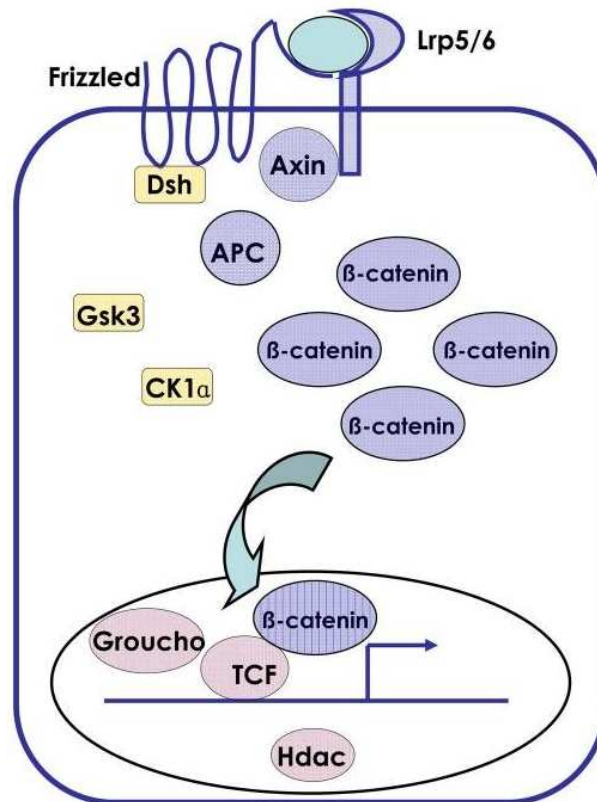


Abbildung 6: Der *Canonical Wnt Signaling Pathway*: Durch Bindung von Lrp 5/6 kommt es zu einer Hemmung des β -Catenin-Abbaus woraus eine Anreicherung des Proteins im Zellkern und der Start der Gentranskription resultieren. (Liu et al., 2008)

Reife, nicht mehr proliferierende Osteoklasten exprimieren alkalische Phosphatase, einen der frühesten Biomarker des Osteoblasten-Phenotyps, und sezernieren Kollagen Typ 1 und weitere Nicht-Kollagen Matrixproteine. (Aubin et al., 2006; Zaidi, 2007) Osteoblasten, die aktiv am Aufbau von Knochenmatrix beteiligt sind, haben einen vergrößerten Zellkern, ein erweitertes endoplasmatisches Reticulum und einen aktiven Golgi-Apparat. Die funktionsfähigen Osteoblasten liegen mittels Cadherinen verankert dem neu gebildeten Osteoid an. (Zaidi, 2007)

Auf der Oberfläche ruhender Knochen findet sich eine Schicht flacher Osteoblasten, die *Bone-Lining-Cells*. Diese Schicht fungiert entweder als

Trennlinie zwischen Knochenmark und Endosteum oder liegt direkt unter dem Periosteum in Kontakt zum mineralisierten Knochen. (Aubin et al., 2006)

Einige reife Osteoblasten werden während der Matrixsynthese in der frischen Knochenmatrix eingeschlossen und differenzieren zu Osteozyten. Diese Zellen produzieren zwar keine alkalische Phosphatase, im Gegenzug ist aber die Expression von Osteopontin stark vermehrt. Osteozyten stehen mit Hilfe von Connexin-medierten *Gap-Junctions* in filipodialen Erweiterungen untereinander in Verbindung. Durch dieses Netzwerk ist es den Osteozyten möglich, physische oder konzentrationsbedingte Veränderungen im umgebenden Knochen zu erfassen und an die Osteoblasten an der Knochenoberfläche zu übermitteln. (Zaidi, 2007)

Osteozyten können über lange Zeiträume ihre Funktionen innerhalb der Knochenmatrix erfüllen. Das Vorkommen leerer Lakunen lässt aber darauf schließen, dass auch Osteozyten zu Apoptose befähigt sind. Allerdings führt der programmierte Untergang von Osteozyten zu Verlusten an Knochenmasse. (Aubin et al., 2006)

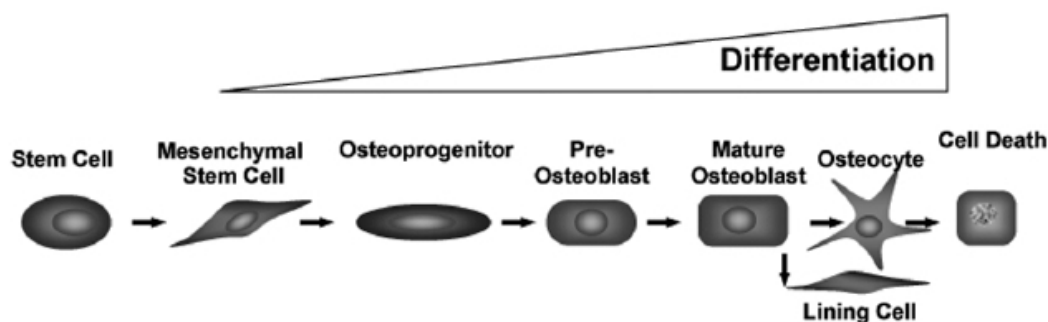


Abbildung 7: Die verschiedenen Stadien der Osteoblastenentwicklung (Aubin et al., 2006)

Funktionen abseits der Knochenbildung

Neben der primären Funktion der Rekrutierung frischen Osteoids und der Mineralisierung desselben, zeigen Vertreter der Osteoblasten-Zelllinie noch andere, physiologisch wesentliche Funktionen. Darunter fällt die, vor allem bei Präosteoblasten, Osteoblasten und Osteozyten zu findende Fähigkeit zur Produktion bestimmter parakriner und autokriner Faktoren als Folge endokriner Stimulation. Die gebildeten Faktoren beeinflussen die Mobilisierung von Osteoprogenitor-Zellen, die Entwicklung von Präosteoblasten, die Regulation des

osteoklastären Knochenabbaus durch Einfluss auf Entwicklung und Fusion mononukleärer Vorläuferzellen zu mehrkernigen Osteoklasten sowie die Aktivität ausdifferenzierter Osteoklasten. Eine bestimmende Rolle spielt hierbei Osteoprotegerin, ein löslicher Faktor der die Osteoklastenbildung hemmen kann. Das Vorliegen von Rezeptoren für Parathormon, RANKL und $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{-Vitamin D}_3$, allesamt Promotoren der Osteoklastenfunktion, an der Osteoblastenoberfläche ist wohl ebenso an der Regulation der Knochenresorption beteiligt. Weiters fungieren Zellen der Osteoblasten-Zelllinie als bedeutende Quelle des *Colony-Stimulating Factors-1* und sezernieren Zytokine und Prostaglandine mit wichtigen Funktionen während der Osteoklastogenese. Auch eine unterstützende Rolle bei der Produktion hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark erscheint nach jüngsten Erkenntnissen plausibel. (Aubin et al., 2006)

Matrixmineralisierung

Die Einlagerung von Mineralien beginnt zwischen den Kollagenfibrillen der Matrix des Osteoid. Extrazelluläre Matrix-Vesikel, wie sie von Chondrozyten und Osteoblasten freigesetzt werden, bewirken eine Akkumulation von Kalzium- und Phosphationen auf begrenzten Raum. Außerdem enthalten die Vesikel ein Gemisch aus Phospholipiden, Kalzium und anorganischem Phosphat, den *Nucleational Core*, der die Bildung von Apatitkristallen initiieren kann, sowie Enzyme, die mineralisierungshemmende Proteine der organischen Matrix degradieren. Da Hydroxylapatit in den Körperflüssigkeiten in geringen Konzentrationen vorkommt, ist eine spontane Sedimentation auf Grund des Überschreitens des Löslichkeitsproduktes nicht möglich, weshalb davon ausgegangen wird, dass andere Faktoren die Präzipitation vorantreiben. Für zwei Phosphoproteine der Knochenmatrix, *Bone Sialoprotein* und *Dentin matrix protein-1*, konnte bereits eine präzipitationsfördernde Wirkung nachgewiesen werden. Allerdings sind beide Substanzen ebenso in der Lage, Kristallbildung und -wachstum zu hemmen. Einige, den Phosphorylierungsgrad von Phosphoproteinen beeinflussende Enzyme, die wichtigsten darunter Phosphoproteinkinasen, Phosphoproteinphosphatasen und alkalische Phosphatase,

konnten erfolgreich mit einem gesteigerten Mineralisierungsgrad in Verbindung gebracht werden. (Robey und Boskey, 2006)

Faktoren mit Einfluss auf die Apatitkristallstruktur

Durch Addition weiterer Ionen zum bestehenden Kristallgitter und durch Zusammenwachsen benachbarter Kristalle mit zunehmendem Alter des Knochens entstehen größere und reinere Kristallstrukturen. Das tatsächliche Wachstum der Apatitkristalle wird von den Gegebenheiten der Kollagenmatrix vorgegeben, wobei auch Nicht-Kollagen Proteine Einfluss haben. Durch Einbau von Fremdionen kommt es zu einer Veränderung der Kristalleigenschaften und in Folge zur Veränderung der Attribute des Knochens. Magnesium- und Strontium-Ionen können an Stelle von Kalzium ins Gitter eingebaut werden, woraus kleinere, unreinere Kristalle resultieren. Das toxische Cadmium wird mit denselben Folgen für die Kristallstruktur in das Gitter eingebaut. Im Gegensatz dazu führt der Einbau von Fluorid-Ionen zur Entstehung größerer Kristalle mit verringerter Löslichkeit. Carbonat-Ionen, die in den Körperflüssigkeiten vorkommen, ersetzen Hydroxyl- und Phosphatreste und können, ebenso wie Citrat, an der Kristalloberfläche absorbiert werden. Neben Fluoriden binden auch andere, therapeutisch relevante Verbindungen an die Apatitoberfläche. Dazu zählen die resorptionshemmenden Bisphosphonate genauso wie die als Fluoreszenzmarker verwendeten Tetrazykline, die zur Bestimmung der Wachstumsrate des Knochens herangezogen wurden. Neben Verunreinigungen durch endo- und exogene Ionen haben auch zelluläre Ereignisse Einfluss auf die Kristalleigenschaften. So kommt es bei verminderter Kristalleinlagerung zur Bildung größerer Kristalle. Beim osteopetrotischen Knochen sind die Kristalle generell kleiner, im Gegensatz zu osteoporotischen Knochen, bei denen große Kristalle persistieren, da sie widerstandsfähiger gegen resorbierende Einflüsse sind.

Größe und Verteilung der Hydroxylapatitkristalle beeinflussen die mechanischen Eigenschaften des Knochens maßgeblich. Zu kleine oder zu wenig Kristalle reduzieren die Widerstandsfähigkeit des Knochens, wohingegen zu viele oder zu

große Kristalle den Knochen zur Brüchigkeit verdammen. (Robey und Boskey, 2006)

1.2.5.2 Osteoklasten und deren Funktion während des Knochenumbaus

Neben Osteoblasten, die den Aufbau frischer Knochenmatrix ermöglichen, sind knochenresorbierende Osteoklasten am Umbau des Skeletts beteiligt. Osteoklasten gehören zur Monozyten/ Makrophagen-Zelllinie und entwickeln sich, ebenso wie Makrophagen, Lymphozyten und dendritische Zellen, unter physiologischen Bedingungen aus hämatopoetischen Stammzellen. (Zaidi, 2007)

Die Regulation der Knochenresorption

Durch Produktion der Zytokine RANKL und *Macrophage Colony-Stimulating Factor* sind, neben Markstromazellen, auch Osteoblasten an der Entwicklung von Osteoklasten maßgeblich beteiligt. Beide Proteine existieren in membrangebundener und gelöster Form und binden an die Rezeptoren RANK (RANKL) und c-Fms (M-CSF). Die Ausbildung von c-Fms wird durch den B-Zell-Transkriptionsmodulator PU.1 ausgelöst. Zu Beginn der Differenzierung können sich Osteoklastenvorläuferzellen ebenso gut zu B-Lymphozyten entwickeln. Die Determination der Funktion wird erst durch die Ausbildung der Rezeptoren RANK und c-fos bestimmt. (Zaidi, 2007)

M-CSF ist an Proliferationsvorgängen, Überleben und Differenzierung der Osteoklastenvorläuferzellen sowie am Überleben der ausdifferenzierten Osteoklasten und zytoskelettären Veränderungen, die Voraussetzung für deren resorptive Tätigkeit darstellen, beteiligt. RANKL, der zur Tumornekrosefaktor-Superfamilie zählt, ist, neben dem Vorliegen von Vorläuferzellen, eine Grundvoraussetzung für die Bildung funktionsfähiger Osteoklasten. Sein natürlicher Gegenspieler ist Osteoprotegerin, das eine hohe Bindungsaffinität zu RANKL aufweist und somit die Konzentration des freien, wirksamen Zytokins kontrolliert. Dieser lösliche Hemmstoff der RANKL-Wirkung wird von Zellen mesenchymalen Ursprungs kontinuierlich, sowie als Reaktion auf Reize wie Zytokine und Steroide, produziert. (Ross, 2006)

Proinflammatorische Zytokine und ihre Bedeutung für den Knochenumbau

Proinflammatorische Zytokine haben eine hemmende Wirkung auf die Osteoprotegerinexpression und führen gleichzeitig zu einem Anstieg an freiem RANKL, woraus ein gesteigerter Knochenabbau resultiert. Dieser Umstand erklärt den gesteigerten Verlust an Knochensubstanz unter hohen Spiegeln proinflammatorischer Botenstoffe wie TNF- α , Interleukin-1, Parathormon und *Parathormon-related Protein* (PTHrP), sowie die osteoprotektiven Einflüsse von Antikörpern gegen TNF und dessen Rezeptor. Lungen- und Brustkrebszellen nutzen die gesteigerte Produktion von PTHrP und die dadurch ausgelöste Verschiebung des RANKL/OPG-Verhältnisses zu osteoklastärer Knochenresorption, wodurch Zytokine und Wachstumsfaktoren aus der Knochenmatrix freigesetzt werden, die wiederum einen stimulierenden Effekt auf die Krebszellen ausüben. Neben OPG steht auch γ -Interferon im Ruf, eine hemmende Wirkung auf die Entwicklung von Osteoklasten auszuüben. (Ross, 2006) Allerdings zeigten zahlreiche *in vivo* Studien eine Stimulation des Knochenabbaus unter γ -Interferon-Behandlung. (Cenci et al., 2003; Key et al., 1995)

Weitere Zytokine mit Wirkung auf Osteoklasten umfassen verschiedene Interleukine, *Granulozyten Macrophage-Colony stimulating factor*, Interferon- β , *Stromal-derived Growth Factor 1*, *Macrophage Inflammatory Protein 1 α* sowie *Monocyte Chemotactic Protein 1*. *MIP α* sowie *MCP-1* werden von multiplem Myelomzellen produziert und üben chemotaktische und proliferative Einflüsse auf Osteoklastenvorläuferzellen aus. Allerdings finden sich für alle genannten Zytokine widersprüchliche Daten hinsichtlich der Wirkung am Menschen. (Ross, 2006)

Andere wesentliche Einflussfaktoren: 1 α ,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ und Östrogen

1 α , 25-(OH)₂-Vitamin D₃ stimuliert die Kalziumaufnahme aus dem Darm und suprimiert die Expression proosteoklastären Parathormons. Trotzdem belegen zahlreiche Human-Studien die resorptionssteigernden Eigenschaften von 1 α , 25-(OH)₂-Vitamin D₃. Diese Wirkung wird durch eine Erhöhung der RANKL-Expression in Verbindung mit der Verringerung der Osteoprotegerin-Produktion

erklärt. Auch Östrogenspiegel haben einen Einfluss auf die Osteoklastenentwicklung, wie an Hand der postmenopausalen Osteoporose leicht ersichtlich ist. Fallende Östrogenspiegel bewirken vermutlich eine gesteigerte Produktion proosteoklastärer Zytokine, die ihrerseits RANKL- und M-CSF-Expression ankurbeln und hemmendes Osteoprotegerin vermindern. Auch ein direkter negativer Einfluss auf die Knochenresorption scheint nicht ausgeschlossen, da Östrogen zum Beispiel die Produktion von Tumornekrosefaktor und RANKL durch T-Lymphozyten senkt. Östrogen bewirkt nämlich eine Verringerung der Antigenproduktion, woraus eine Senkung der Aktivität der T-Zellen resultiert. Weiters lassen einige Studien auf eine Erhöhung der Lebensdauer und Funktion reifer Osteoklasten über Beeinflussung der Pro-Osteoklasten schließen. (Ross, 2006)

Die Wirkung von Glukokortikoiden auf die Zellen des Knochenmetabolismus

Therapeutisch relevant sind die proresorptiven Eigenschaften endogener und exogener Glukokortikoide, die einerseits durch die Einleitung der Apoptose bei Osteoblasten zu erklären ist, andererseits aber ebenso auf eine verminderte Apoptoseneigung der Osteoklasten zurückzuführen ist. Das Glukokortikoid Prednisolon bewirkte bei Mäusen bereits nach sechs Tagen eine massive Verringerung der spinalen Knochenmineraldichte um 7,4 %. Nach 27 Tagen Behandlung mit Prednisolon hatte sich die Knochendichte um weitere 2 % verringert. Dieser Effekt konnte in mehreren Experimenten bestätigt werden (Abnahme von $8,8 \% \pm 1$ standard error of the mean). (Weinstein et al., 2002)

Auch Prostaglandine, in hohen Dosen verabreicht, verschieben das RANKL/Osteoprotegerin-Verhältnis auf die resorptive Seite.

Der Einfluss von Zytokinen auf die knochenresorbierenden Zellen

Intrazellulär wird die Proliferation und Entwicklung der Osteoklasten vor allem von drei Proteinklassen bestimmt: Adapterproteinen, Kinasen und Transkriptionsfaktoren. Unabhängig von nukleären Faktoren erfolgt die Regulation des Zytoskeletts vorwiegend über Kinasen. Im Gegensatz dazu wird die Differenzierung zu vollwertigen, mehrkernigen Osteoklasten überwiegend

über Genexpressions-Regulationsmechanismen kontrolliert. Ein weiterer Signaltransduktionsweg, der ebenso über die Expression osteoklastenspezifischer Gene wirkt, stellt die Aktivierung der Phosphatase Calcineurin, die durch RANKL-induzierte Kalziumfreisetzung induziert wird, dar. Die folgende Tabelle nennt die wichtigsten, an den Signaltransduktionskaskaden beteiligten, Oberflächenrezeptoren sowie deren Funktion am Osteoklasten. (Ross, 2006)

Proliferation	: $\alpha\text{v}\beta 3$, C-Fms
Reorganisation des Zytoskeletts	: $\alpha\text{v}\beta 3$, C-Fms, RANK
Differenzierung zu reifen Osteoklasten	: c-Fms, RANK, Tumornekrosefaktor-rezeptor 1, Interleukin-1-rezeptor

Tabelle 2: Faktoren mit Einfluss auf osteoklastäre Funktionen (Ross, 2006)

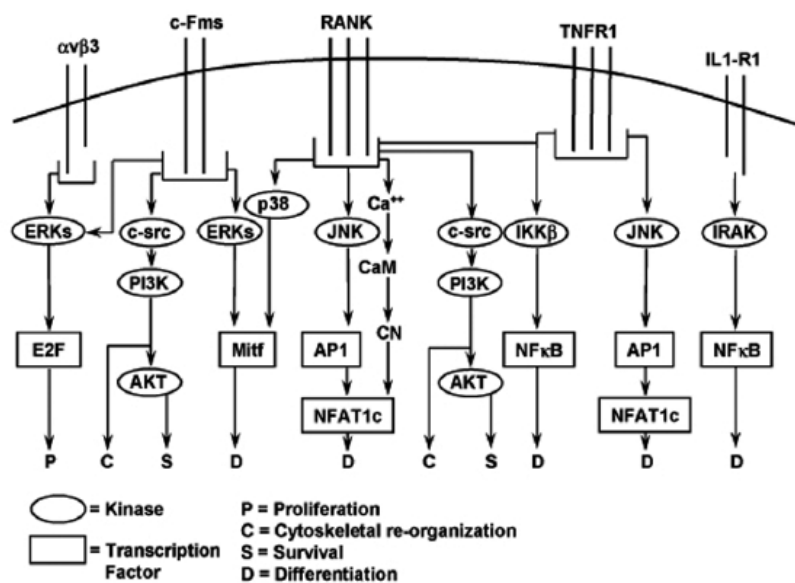


Abbildung 8: Wesentliche intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden der Osteoklasten (Ross, 2006)

Knochenresorption

Osteoklasten sind in der Lage, die Bestandteile organischer Knochenmatrix auf enzymatischem Wege abzubauen und dadurch das, in Form von Hydroxylapatit gebundene Kalzium aus seinen endogenen Speichern freizusetzen. Dazu stellen Osteoklasten über Integrine, $\alpha\text{v}\beta$ -Heterodimere mit langen extrazellulären Domänen, deren Grundfunktion in der Vermittlung von Matrix-Zell-Interaktionen

besteht, eine Bindung zu Matrixproteinen mit RGD-Sequenz her und generieren, durch Formierung der Aktin-Ring-Struktur, die *Sealing-Zone*, die das Areal des Knochenumbaus von angrenzenden Gebieten isoliert. (Ross, 2006)

Im Aktin-Ring fungieren Podosomen als Äquivalente der üblichen *Focal Adhesions*. Podosomen sind hoch dynamische, aktin-reiche Strukturen die aus einem zylindrischen Kern aus F-Aktin bestehen. Diese zylindrischen Strukturen sind von $\alpha\beta3$ -Integrinen und assoziierten Proteinen des Zytoskeletts umgeben. Der dichte Kern der Podosomen ist von einem lose organisierten Aktin-Netzwerk, der Podosomen-Wolke, umgeben. (Yogo et al., 2007)

Die Umstrukturierung des Zytoskeletts zur Ausbildung des Aktin-Rings sowie von Podosomen wird über die Rho GTPase vermittelt. Weiters spielt Rho bei der Motilität und Resorptionstätigkeit der Osteoklasten eine Rolle. (Ross, 2006)

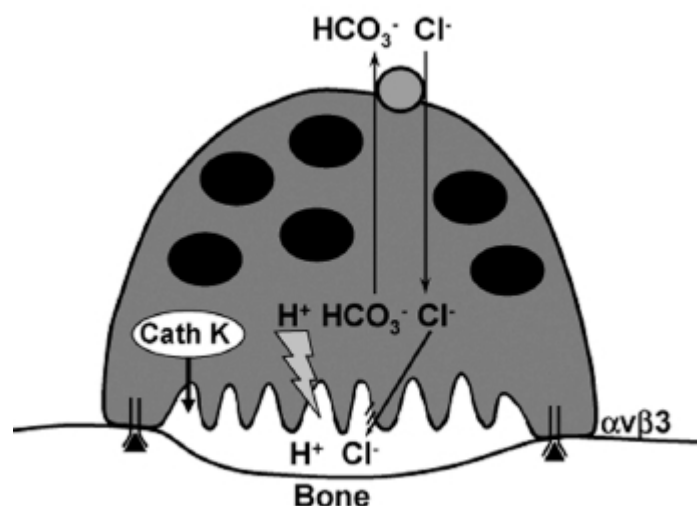


Abbildung 9: Ein mehrkerniger Osteoklast während der Resorptionstätigkeit (Ross, 2006)

Der isolierte Bereich über der Knochenoberfläche wird unter Einsatz von Protonenpumpen azidifiziert, wobei der saure pH-Wert unter 4, in Verbindung mit matrixproteindegradierenden Enzymen, wie Cathepsin K und anderen Matrix-Metallo-Poteasen, zum Abbau des Knochens und zur Bildung von Resorptionslakunen führt. Aus dem Verband gelöste Proteine werden durch Transzytose aus dem Resorptionsmilieu entfernt und an der dorsolateralen Seite des Osteoklasten freigesetzt. Über einen H^+/Cl^- -Antiporter wird die

Protonenbilanz ausgeglichen. Die, durch Protonenausscheidung resultierende Alkalisierung des Zytoplasmas wird durch Austausch von HCO_3^- gegen Cl^- aufgehoben. (Zaidi, 2007)

Die lytischen Effektor-Enzyme werden, in azidifizierten Vesikeln verpackt, über die, der Knochenmatrix zugewandten, Osteoklastenmembran, vermutlich über Mikrotubuli, in den abgetrennten Bereich sezerniert, wobei die Plasmalemma eine einzigartige, die Exozytose begünstigende Struktur, die *Ruffled Membrane*, ausbildet. Die GTPase Rac zeigt sich für die Bildung von Lamelliopodien, und somit für die Ausformung der *Ruffled Membrane*, verantwortlich. Neben seiner Funktion während der Vermittlung der Bindung der Zelle an die RGD-Sequenzen von Matrixproteinen erfüllt $\alpha\beta 3$ wesentliche Signaltransduktionsaufgaben, die, über den Faktor c-Src an der Ausbildung resorptiver Zellorganellen, wie der *Ruffled Membrane*, beteiligt scheinen. Die Wirkung auf das Zytoskelett wird hierbei durch die Phosphoinositol-3-Kinase vermittelt, die Phosphatidylinositol-biphosphat ins aktive Triphosphat, das zahlreichen zytoskelettären Proteinen als Bindungspartner dient, umwandelt. Ein Zielprotein des aktivierten Phosphatidylinositols ist Akt, das Proliferation und Überleben der Osteoklasten stimuliert. PI-3-K wird ebenso durch Bindung von RANKL und M-CSF an ihre Rezeptoren aktiviert. (Ross, 2006)

Die Ablösung des Osteoklasten vom Ort der Resorption erfolgt als Reaktion auf die erhöhten Kalziumspiegel in Folge der fortschreitenden Matrixdegradation. Kalzium-Sensoren an der Oberfläche des Osteoklasten werden bei einer Konzentration von etwa 40 mM Kalzium aktiviert und bewirken die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern, gepaart mit einem Kalzium-Einstrom aus dem Extrazellulärraum. Steigende intrazelluläre Kalziumspiegel aktivieren die NO-Synthetase, die Stickstoffmonoxid produziert. Diese Vorgänge ermöglichen es dem Osteoklasten, sich von der Resorptionsstelle zu lösen. Eine neuerliche Bindung an die Knochenmatrix und somit erneute Resorption ist unter Aufhebung der vorher genannten Mechanismen mittels Interleukin-6 möglich. (Zaidi, 2007)

1.2.6 Wnt-Signaling - ein wesentlicher Faktor des Knochenmetabolismus

Wnts sind eine Familie aus 19 cysteinreichen Glycoproteinen, die über Bindung an einen membranständigen Rezeptor zahlreiche intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden initiieren können. Diese Signaltransduktionsmechanismen spielen bei der Entwicklung von Knorpel und Knochen eine wesentliche Rolle. Aktivität dieser Signaltransduktionsmoleküle ist in Bereichen endochondraler und intramembranöser Knochenbildung sowie am Perichondrium und an den Osteoblasten feststellbar. Die physiologischen Quellen von Wnts im Knochenmikroenvironment sind ungeklärt. Es wird angenommen, dass beim Abbau oder Remodeling von Knochenmatrix Wnts freigesetzt werden. Es ist bekannt, dass Osteoblasten Wnts produzieren können.

Der korrespondierende Membranrezeptorkomplex setzt sich aus einem von zehn *frizzled G-protein coupled receptors* und einem von zwei *low-density lipoprotein receptor-related proteins* (Lrp 5 oder 6) zusammen. In Abhängigkeit der vorliegenden Rezeptorkomponenten wird eine von zahlreichen Signalkaskaden aktiviert. (Liu et al., 2008)

1.2.6.1 Die kanonische Signalkaskade

Der kanonische Signaltransduktionsweg, auch β -Catenin-abhängiger Weg genannt, ist die am besten aufgeklärte, durch Wnt ausgelöste Signalkaskade. Hierbei spielt das intrazellulär vorliegende β -Catenin eine tragende Rolle. Üblicherweise liegt β -Catenin zusammen mit dem *adenomatous polyposis coli-Protein* und Axin in Form eines Komplexes vor. In diesem Komplex wird β -Catenin durch die CK1 und GSK3 phosphoryliert, in weiterer Folge durch Interaktion mit β -TrCP ubiquitiniert und schlussendlich durch Proteasomen abgebaut. Durch Bindung von Wnt an seinen Rezeptor wird dieser Abbauprozess verhindert und β -Catenin reichert sich in Cytoplasma und Nukleus an. Im Kern tritt β -Catenin mit Transkriptionsfaktoren in Wechselwirkung, was zur Expression bestimmter Gene führt. Hier ist besonders der Transkriptionsfaktor LEF/TCF zu

nennen. Ohne Wnt-Signal entfaltet dieser Transkriptionsfaktor zusammen mit Groucho eine hemmende Wirkung auf die Gen-Transkription. (Liu et al., 2008)

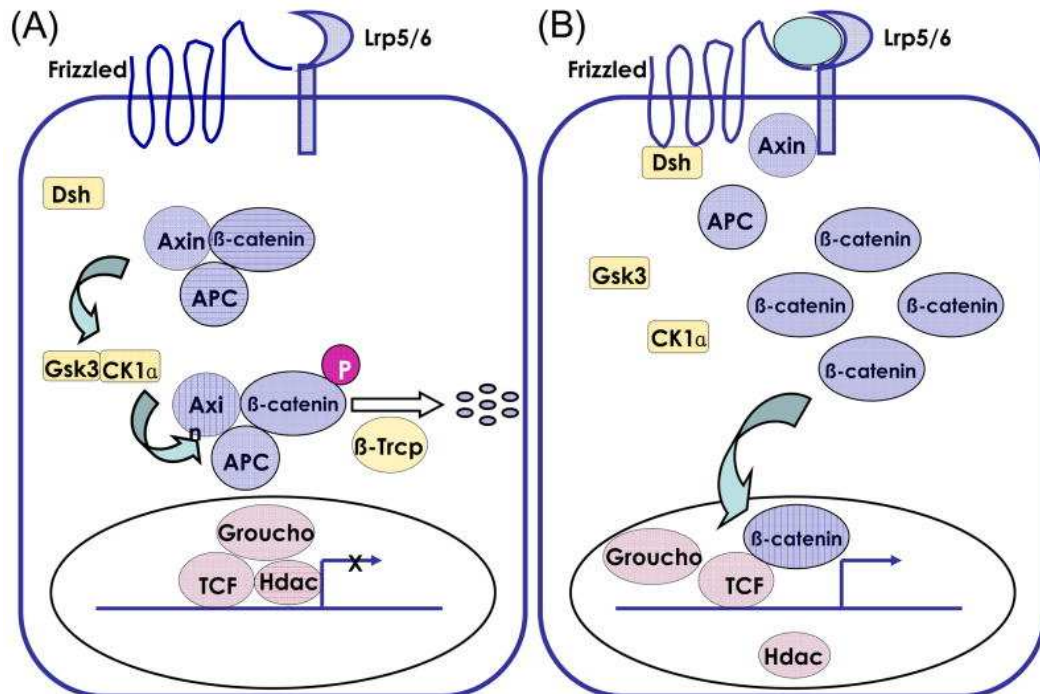


Abbildung 10: Die Abbildung zeigt den kanonischen Signaltransduktionsweg ohne [A] und mit einem Stimulus [B] durch Bindung von Wnt an seinen Rezeptor. Ohne Wnt-Signal wird β -Catenin durch Proteasomen abgebaut und es erfolgt keine Gentranskription. In Folge der Bindung von Wnt an den Rezeptor wird der β -Catenin-Abbau gestoppt und es kommt zu einer Anreicherung von β -Catenin im Zellkern. Die Transkription bestimmter Gene wird gestartet. (Liu et al., 2008)

1.2.6.2. Die nicht-kanonische Signalkaskade

Dieser Signaltransduktionsweg ist auch als β -Catenin-unabhängiger Signaltransduktionsweg bekannt. Die tatsächlich involvierten Signaltransduktionsmechanismen sind sehr unterschiedlich und umfassen Kalziumströme, JNK sowie kleine und heterotrimere G-Proteine. Der genaue Ablauf der Signalübertragung ist bis jetzt ungeklärt. (Liu et al., 2008)

1.2.6.3 Einflussfaktoren des Wnt-Signaling

Zahlreiche Antagonisten sind an der Regulation des Wnt-Signaling beteiligt. Dazu zählen *secreted frizzled-related proteins* und *Wnt inhibitory factor 1*, die die Interaktion von Wnt und seinem Rezeptor hemmen. Dkk 1, eines von vier Mitgliedern der Dickkopffamilie, bindet mit hoher Affinität an Lrp-Proteine wodurch es zur Internalisierung des Rezeptor-Komplexes für Wnt kommt. Ebenso hemmt Sclerostin die Aktivität des Lrp-Teils des Wnt-Rezeptors. Analog den Sfrps regulieren Axin 1 und 2 die kanonische Signalkaskade negativ. Dies geschieht durch eine Verstärkung des β -Catenin-Abbaus.

Auch innerhalb des Zellkerns üben Proteine einen regulierenden Einfluss auf die Wnt-Signalübertragung aus. So zum Beispiel Chibby, das an den C-Terminus von β -Catenin bindet, und ICAT mit seiner Fähigkeit, die Bindung von β -Catenin an TCF zu blockieren. (Liu et al., 2008)

1.2.6.4 Wnt-Signaling und Knochenzellen

1.2.6.4.1. Osteoblasten

Wnts regulieren die Osteoblastogenese über die β -Catenin-abhängige Signaltransduktionskaskade. Zahlreiche Untersuchungen deuten auf die wesentliche Beteiligung von β -Catenin an der Entwicklung und Funktion von Osteoblasten hin. So konnte in zahlreichen Studien an Mäusen nachgewiesen werden, dass die β -Catenin-abhängige Signaltransduktion maßgeblich für frühe und späte Osteoblastendifferenzierungsschritte ist. Die Entfernung von β -Catenin aus mesenchymalen Stammzellen von Dermo1-Cre Mäusen führte zu einer drastischen Verringerung der Expression früher Osteoblasten-Marker wie Collagen Typ I, Osterix und Osteocalcin. Durch die Entfernung von β -Catenin aus Osterix-positiven Osteoblasten wurde deren Entwicklung zu reifen Osteoblasten verhindert.

Durch Knock-out des Lrp5 Gens in Mäusen kam es kurz nach der Geburt der Versuchstiere zur Entwicklung einer *early-onset* Osteoporose, obwohl Embryos eine normale Knochenbildung aufwiesen. Dieser Umstand deutet auf die wesentliche Rolle von Lrp5 beim Erhalt der Knochenmasse hin. Diese Annahme

wird durch die Erkenntnisse einer *gain-of-function*-Mutation des Lrp5-Gens beim Menschen gestützt. Diese Mutation führt zu einer erhöhten Knochenmasse Betroffener. Ein korrespondierendes Mausmodell, welches ebenfalls diese Mutation im Lrp5 Genlokus aufweist, zeigte ebenso eine erhöhte Knochenmineraldichte. Diese wurde auf eine gesteigerte Aktivität der Osteoblasten sowie eine verringerte Apoptoseneigung der knochenbildenden Zellen zurückgeführt.

Lrp6-knock-out Mäuse sterben bei der Geburt. Embryos zeigen Hirndefekte, Defekte des axialen Skeletts und Fehler in der Ausbildung der Gliedmaßen. Ringelschwanzmäuse, Träger einer Mutation des Lrp6-Gens die die Übertragung des Wnt-Signals negativ beeinflusst, zeigen ebenso Missbildungen des axialen Skeletts, der Finger und des Neuralrohrs.

Da Sclerostin über Interaktion mit Lrp5 und 6 als Antagonist des Wnt-Signaling fungiert, führt eine Mutation im Lrp5 Gen zu erhöhter Knochenmasse, da die Bindungsaffinität des SOST-Genproduktes Sclerostin verringert ist. Sclerostin wird hauptsächlich in Osteozyten gebildet.

Dkk 1,2 und 4 beeinflussen über Interaktion mit Lrp5 und 6 den kanonischen Signaltransduktionsweg. Dkk1 reguliert das Wnt-Signaling hierbei negativ und kontrolliert so die physiologische Knochenmasse. Ein Knock-out des DKK2-Gens bei Mäusen führte zu Mineralisationsdefekten, Osteopenie und niedriger Knochenmasse. Deswegen wird angenommen, dass Dkk2 an finalen Differenzierungsschritten von Osteoblasten beteiligt ist.

Die Gruppe der *secreted frizzle receptor proteins* besitzt ebenfalls eine antagonistische Wirkung auf das Wnt-Signaling. Sfrp-1-Spiegel steigen mit fortschreitender Differenzierung der Osteoblasten und erreichen ihren Höhepunkt im Preosteozyten-Stadium. Sfrp-1 *Knock-out*-Mäuse zeigen erhöhte trabekuläre Knochendichte und Knochenvolumen, vermutlich in Folge der Aktivierung des Wnt-Signaling und verringerter Apoptose von Osteoblasten und Osteozyten.

Durch Inaktivierung von Axin2 werden Proliferation und Promotion der Osteoblasten gesteigert. Dies führt zu einer beschleunigten Rekrutierung von Osteoprogenitor-Zellen, gesteigerter Knochenbildung, verbesserter Mineralisation und der erhöhten Expression von Markern des Knochenaufbaus.

Inaktivierung von GSK-3 β in Mäusen führt zum Tod des Föten. Bis zum Zeitpunkt des Todes sind keine abnormen Entwicklungen des Skeletts feststellbar. Durch orale Verabreichung des GSK-3 β Hemmstoffs LiCl und des dualen GSK-3 α/β Inhibitors 603281-31-8 kommt es zu einer Stimulation der Knochenbildung bei Mäusen und Ratten. (Liu et al., 2008)

1.2.6.4.2. Osteoklasten

Wnt-Signaling reguliert die Osteoklastenzahl indirekt über das Verhältnis von Osteoprotegerin zu RANKL. Die osteoblasten-spezifische Inaktivierung von β -Catenin bei Mäusen führte zu einer Abnahme der Knochenmasse, welche auf eine Erhöhung der Osteoklastenzahl zurückgeführt wird. Der Anstieg in der Osteoklastenpopulation wird wiederum auf die verringerte Expression von Osteoprotegerin zurückgeführt. Im Gegensatz dazu führte die Aktivierung des Wnt-Signaling in einem Co-Kultursystem aus murinen Milzzellen zu einer Abnahme der RANKL-Expression und, damit verbunden, zu einer Hemmung der Entwicklung TRAP-positiver, mehrkerniger Osteoklasten.

Die osteoblasten-spezifische Aktivierung von β -Catenin führte auf Grund von Defekten bei der Differenzierung und Funktion der Osteoklasten zu einer erhöhten Knochenmasse bei Mäusen. Dieser Umstand wurde auf die vermehrte Expression von Osteoprotegerin zurückgeführt. Die Inaktivierung von APC führt zu einer massiven Zunahme der Knochenbildung und dem Verschwinden sämtlicher Osteoklasten.

Tcf1-*Knock-out*-Mäuse zeigen signifikant verringerte Knochenmasse. Die Osteoblastenzahl ist bei diesen Mäusen unverändert, allerdings wird die Bildung von Osteoklasten durch die Verringerung der Osteoprotegerin-Spiegel begünstigt. (Liu et al., 2008)

1.3 Ziele der Diplomarbeit

Wie mehrere Quellen bestätigen (Park et al., 2004; Trzeciakiewicz et al., 2009; Yun et al., 2007) sind gewisse pflanzliche Polyphenole in der Lage, Knochenzellen und damit den Metabolismus des Knochens zu beeinflussen. Da für einige Vertreter der Ellagitannine mit NHTP-Gruppen bereits eine Hemmung des osteoklastären Knochenabbaus aufgezeigt werden konnte, weiteten wir unsere Untersuchungen auf andere Vertreter dieser Ellagitannin-Familie aus. Diese waren die Ellagitannin-Dimere Roburin A und Roburin D, die im Rahmen von *in vitro* Untersuchungen hinsichtlich ihrer Wirkung auf reife Osteoklasten untersucht wurden.

Das erste Ziel der Untersuchungen bestand darin, den Effekt der Ellagitannin-Dimere auf den osteoklastären Knochenabbau zu bewerten. Dazu wurden reife Osteoklasten im Rahmen eines Pit-Assay mit Ellagitannin-Lösungen verschiedener Konzentrationen behandelt, um die Auswirkungen auf die Resorptionstätigkeit der Zellen feststellen zu können.

In weiterer Folge untersuchten wir die Auswirkungen der Behandlung mit einer Ellagitannin-Lösung bestimmter Konzentration auf die intrazellulären Signaltransduktionskaskaden reifer, aus RAW 264.7 Zellen gewonnener, Osteoklasten. Durch Aufklärung der Veränderung des Phosphorylierungsmusters verschiedener Schlüsselproteine der Signalübertragung hofften wir, erste Hinweise auf den zugrundeliegenden Wirkungsmechanismus der Substanzen zu erlangen. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf Gemeinsamkeiten der Wirkung beider Dimere auf die Aktivierung der betrachteten Signalproteine gelegt.

2.Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräteliste

Analysenwaage	Firma Sartorius, MC 210 P
Chemoluminescence films	Kodak BioMax Light Film Lot 425 005 und GE Healthcare Amersham Hyperfilm ECL
Computer	Apple Power Mac
Elektrophorese-Kammer	Firma Bio-Rad
ELISA Reader	Firma Labsystems Multiskan MS
Inkubator	Firma Kendro HERA Cell 240
Inkubierschrank	BFL 3032
Kaltlichtlampe	Firma Schott KL 1500 electronic
Knochensäge	Firma Buehler Isomet low speed saw
Kühlschrank -80°C	Jouan VX 490
Magnetrührer inkl. Heizung	Ikamau RCT
Mikroskop	Firma Nikon Optiphot-2-OD
Mikroskop	Firma Olympus
pH-Meter	Firma Inula Metrohm 713 pH Meter
Schüttler	Firma Edmund Bühler Swip
Spannungsgerät f. SDS-PAGE	Firma Bio-Rad Power PAC 3000
Spannungsgerät f. Western Blot	Firma Bio-Rad Model 1000/500 Power Supply
Sterilwerkbank (Laminar Airflow)	Firma Ehret
Thermomixer	Firma Eppendorf Thermomixer 5436
Trockenschrank für Filme	Firma Kindermann, Trockner
Vortexer	Firma Bender & Hobein AG Vortex Genie 2
Wasserbad	Firma Aigner GFL 1066
Zentrifuge	Firma Eppendorf Centrifuge 5415C
Zentrifuge	Firma Bartelt HERMLE Z 323K
Digitalkamera	Firma Nikon Coolpix 995
Sägeblatt	Firma Buehler Diamond wafering blade/series 15 HC Diamond
Eppendorf-Gefäße	Firma Eppendorf
Injektionsnadeln	Firma Rose GmbH, Luer/NSP
Kulturplatten(6-well, 48-well)	Firma Iwaki und Fa. Greiner
Polypropylenröhrchen	Firma Greiner
Zentrifugenröhrchen	Firma Sterilin

2.1.2. Substanzenliste

α -MEM	Fa. Gibco BRL
BSA	Fa. Sigma-Aldrich, Lot 023K0629
	Fraktion V
ECL Detections Lösung	Detection reagents 1 und 2 1:1
	Mischung
Entwicklungslösung f. Film	Fa. ADEFO Chemie, Adefofix Mix
	Fixierkonzentrat
Ethanol	Fa. Sigma-Aldrich Laborchemikalien
Filterpapier für Western Blot	Fa. Schleicher&Schuell, Gel-Blotting-Papiere No. 426 690
Fixierlösung für Film	Fa. ADEFO Chemie, Adefofix 90
Isopropylalkohol	Fa. Merck
Lower TRIS pH=8,8	Siehe 2.1.3
Lysis Buffer	Siehe 2.1.3
Molekulargewichtsstandard	Fa. Invitrogen, Cat. No. LC5925
	SecBlue Plus2 Prestained, Lot# 1313648
	Siehe 2.1.3
Natriumazid 500x	Fa. Schleicher&Schuell, Protran BA
Nitrozellulose	85 Nitrocellulose 0,45µm Lot FB0348-1
	Fa. Gibco
P/S Penicillin/Streptomycin	Siehe 2.1.3
PBS(Phosphate Buffered Saline Solution)	Siehe 2.1.3
Ponceau Rot 0,2 %	Fa. Cayman Chemical Company
Prostaglandin E ₂	Fa. BioRad DC Protein Assay
Protein Assay	Fa. R&D Systems
rm-RANKL	Siehe 2.1.3
Running Buffer 10x pH=8,9	Siehe 2.1.3
Running gel 10 %	Siehe 2.1.3
Sample Buffer 4x	Siehe 2.1.3
Roburin A	<i>Institut Européen de Chimie et Biologie und Centre de Recherche en Chimie Moléculaire</i>
	<i>Institut Européen de Chimie et Biologie und Centre de Recherche en Chimie Moléculaire</i>
Roburin D	
Fetales Kälberserum	Fa. Dipro
Stacking gel	Siehe 2.1.3
Stripping Buffer 1x	Siehe 2.1.3
TBS 10x	Siehe 2.1.3
Toluidinblau Lösung	Siehe 2.1.3
Transfer Buffer (pH= 8,3-8,4)	Siehe 2.1.3
Tween 20	Fa. Sigma-Aldrich Laborchemikalien
Upper TRIS pH=6,8	Siehe 2.1.3
1 α ,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃	Hoffmann-La Roche Wien

2.1.3 Puffer und Lösungen

• 1x Running Puffer	286,5 g Glycin + 60,5 g Tris-Base + 40,0 g SDS mit Wasser auf 2000 ml auffüllen, 1:10 verdünnen
• 0,1 % Tris-Puffered Saline Solution mit Tween-20 (TBS-T 0,1 %)	0,1 g Tween-20 + 99,9 g Tris Puffered Saline Solution
• 0,2 % Ponceaurot Färbelösung	0,2 g Ponceaurot + 3,0 g Trichloressigsäure mit Wasser auf 100 ml auffüllen
• 1x Sample Puffer	1 Teil 4x Sample Puffer + 3 Teile Wasser
• 4x Sample Puffer	TRIS Base 1,52 g + Glyzerin 9,45 g + SDS 6 g + Bromphenolblau 0,2 g + EDTA 0,116 g
• Blocking Solution	5 g Trockenmilch-Pulver + 95 g TBS-T 0,1 %
• Toluidinblau-Lösung	1 g Toluidinblau + 1 g Natrium-Borat + 98 g destilliertes Wasser
• Lösung des primären Antikörpers	0,2 g BSA + 5 ml TBS-T 0,1 % 4 ml der Lösung + 8 µl NaN_3 + 4 µl primärer Antikörper
• Lösung des sekundären Antikörpers	0,1 g BSA + 4 ml TBS-T 0,1 + 0,8 µl Sekundärer Antikörper
• Lower TRIS pH=8,8	TRIS Base (1,5M) 18,17 g + 10 % SDS Lösung 4 ml mit Wasser ad 100 ml
• Lysis-Puffer	1,5 ml Frackelton Buffer + 75 µl NaF + 7,5 µl Aprotinin + 15 µl Leupeptin + 15 µl o-Vanadate + 1,5 µl Pepstatin + 15 µl PMSF
• Natriumazid 500x	NaN_3 0,1 g + Wasser 1 ml

• Running Gel 10 %	1,43 ml Wasser + 880 µl Lower TRIS + 1,17 ml Acrylamid, +1,05 µl TEMED + 17,5 µl APS 10 %
• Stacking Gel	945 µl Wasser + 375 µl Lower TRIS + 195 µl Acrylamid + 2,4 µl TEMED + 15 µl APS 10 %
• Stripping Puffer	2 % SDS Lösung 2 g + TRIS HCl (62,5 mM) 0,931 g + β- Mercaptoethanol (100 mM) 700 µl mit Wasser ad 100 ml
• Transfer Puffer	Glycin 18 g + TRIS Base 3,765 g mit Wasser ad 2000 ml + 500 ml MeOH
• Tris-Puffered Saline Solution	TRIS Base 24,20 g + NaCl 80 g mit Wasser ad 1000 ml, verdünnen auf 1x und pH=7,6 einstellen
• Upper TRIS pH=6,8	TRIS Base (0,5 M) 6,06 g + 10 % SDS Lösung 4 ml mit Wasser ad 100 ml

2.1.4 Kulturmedien

Als Nährmedium für die Co-Kultur dient α -MEM, das in Pulverform vorliegt. Das Pulver wird in 10 Liter Wasser mit Gewebekulturqualität aufgelöst und mit 2,2 g Natriumbicarbonat versetzt und anschließend mittels Salzsäure oder Natronlauge auf einen pH-Wert von 7,1 eingestellt. Abschließend wird das Medium mit Hilfe eines Filters mit der Maschenweite 0,2 μ m steril filtriert.

Das sterile α -MEM Kulturmedium wird mit fetalem Kälberserum (10 % der Gesamtmenge an Medium) versetzt, um den Zellen die zur Entwicklung benötigten Wachstumsfaktoren zur Verfügung zu stellen. Für die Kultur der Osteoblasten wird hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum in α -MEM herangezogen. Alle weiteren Kulturschritte werden unter Verwendung von α -MEM mit fetalem Kälberserum durchgeführt. Um mikrobiologischen Befall des Nährmediums über den Kulturzeitraum zu verhindern, wird eine Mischung aus Penicillin und Streptomycin (1 % der Gesamtmenge an vorbereitetem Medium) zugesetzt.

2.1.5 Verwendete Zelllinien

2.1.5.1 Zelllinien zur Durchführung des Pit-Assay

■ Primäre Osteoblasten 10.06.06: Die Osteoblasten stammen von der Schädeldecke neugeborener bis maximal zwei Tage alter Mäuse. Die Schädeldecke wird entfernt und die Osteoblasten mit Hilfe enzymatischer Verdauung mittels Kollagenase-Dispase freigesetzt. Die gewonnenen Osteoblasten werden aufgeteilt und in frischem Medium ausgesät. Nach einer weiteren Passage werden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

■ Murine Knochenmarkszellen: Diese Zellen werden von Unterschenkelknochen adulter BALb/c-Mäuse gewonnen. Der Knochen wird von Haut und Muskeln befreit und das Mark mittels Kulturmedium mit fetalem Kälberserum für Knochenmark unter sterilen Bedingungen ausgewaschen. Durch Zentrifugieren

und Entfernen der überstehenden Flüssigkeit kann die Konzentration der Knochenmarkssuspension den Erfordernissen angepasst werden.

2.1.5.2 Zelllinien der Signaltransduktionsuntersuchungen

■ RAW-Zelllinie 264.7 (ATCC®-Nummer: TIB-71™): Die Zellen dieser Makrophagen-Zelllinie stammen von einem, durch intraperitoneale Injektion von Abelson-Leukämie-Virus induzierten, Tumor einer männlichen Maus. Zellen dieser Zelllinie tragen Rezeptoren für Immunglobuline und produzieren Lysozyme. Dieser Zelllinie wird gerne bei Studien über Apoptose, Entzündungsreaktionen und metabolische Vorgänge eingesetzt.

2.2. Methoden

2.2.1 Pit-Assay

2.2.1.1 Co-Kultur

Zur Generierung funktioneller, reifer Osteoklasten wird ein System aus Osteoblasten und murinen Knochenmarks-Stammzellen verwendet. In diesem Co-Kultur-System erfolgt die Differenzierung osteoklastärer Vorstufen aus den Knochenmarkszellen von BALB/c-Mäusen, wobei Osteoblasten alle benötigten Wachstumsfaktoren für den Entwicklungsprozess beisteuern. Die Vorstufen fusionieren in weiterer Folge zu resorptionsfähigen Osteoklasten.

Pro cm² Wachstumsfläche einer 48-Well-Platte werden 83,300 Zellen ausgesät. Dies entspricht zwei Millionen Osteoblasten pro Kulturplatte. Zur Aussaat dient eine Suspension von 4 Millionen Osteoblasten in 24 ml Medium mit hitzeinaktiviertem Kälberserum. Die Platte wird über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ mit den Osteoblasten inkubiert.

Die Osteoklastenvorläuferzellen entwickeln sich aus pluripotenten Stammzellen, wobei pro Kulturplatte das Knochenmark von 2 Unterschenkelknochen der Hinterläufe einer Maus verwendet wird. Die Unterschenkelknochen werden von Haut und Muskeln befreit und das Knochenmark mit Hilfe von Kulturmedium

ausgewaschen. Durch Zentrifugieren der Suspension bei 1500 Umdrehungen pro Minute und 4°C werden die festen Anteile von dem flüssigen Überstand getrennt. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in einer adäquaten Menge Kulturmedium mit Kälberserum aufgenommen. Die Kulturplatte wird mit 0,5 ml der Knochenmarkssuspension pro Well beladen. Anschließend werden 1α , 25-(OH)₂-Vitamin D₃ in einer Konzentration von 1×10^{-9} M sowie Prostaglandin E₂ in einer Konzentration von 1×10^{-6} M zugesetzt. Die Platten werden bei 37°C und 5 % CO₂ aufbewahrt. 48 Stunden nach Aussaat der Knochenmarkszellen erfolgt ein Mediumtausch unter Zusatz von 1α , 25-(OH)₂-Vitamin D₃ und Prostaglandin E₂ der oben angeführten Konzentration. Am dritten Tag nach Aussaat der Markzellen-Suspension sind bereits mehrkernige Osteoklasten feststellbar. Nun erfolgt ein neuerlicher Mediumtausch unter Zusatz von Prostaglandin E₂ und 1α , 25-(OH)₂-Vitamin D₃, sowie der Zusatz der Testsubstanz und 5 N Salzsäure gemäß der Abbildung 11. Die Co-Kultur wird für maximal sechs Tage fortgeführt.

2.2.1.2 Pit-Assay

Die Resorptionsfähigkeiten der in der Co-Kultur gewonnen Osteoklasten, sowie die Einflüsse der untersuchten Substanzen wird an Hand des Abbaus von Knochenplättchen beurteilt. Pro Well einer 48er-Well-Platte werden vier rechteckige Plättchen, die von einem Rinderknochen gewonnen wurden, mit Hilfe von sterilem Silikon eingeklebt. Die Plättchen wurden zuvor, in Ethanol und Wasser suspendiert, in einem Ultraschallbad von anhaftenden Verunreinigungen befreit und anschließend unter sterilen Bedingungen (Laminar-Air-Flow) 15 Minuten mittels UV-Strahlung sterilisiert. Die eingeklebten Knochenplättchen werden im Gewebekulturmedium bei 37°C und 5 % CO₂ vorinkubiert. Nach Aussaat der Osteoblasten und Generierung resorptionsfähiger Osteoklasten auf den Knochenplättchen wird am dritten Kulturtag in Rahmen eines Mediumtauschs das zu testende Ellagitannin zugesetzt. Dies erfolgt unter Verwendung einer Stammlösung (100 µM) des Ellagitannins, die durch Lösen des festen Extraktes in Kulturmedium hergestellt wird. Mit Ausnahme der Kontrollgruppe [A] wird in jeweils 4 Wells der Kulturplatte eine Mischung aus reinem Kulturmedium und Ellagitannin-Stammlösung zugesetzt, wobei Verdünnungen zu 50 µM [B], 10 µM

[C], 5 μM [D], 1 μM [E] und 0,1 μM [F] hergestellt werden. Die Hälfte der Wells jeder Verdünnungsstufe, sowie der Kontrollgruppe werden mit 2,3 μl 5 N Salzsäure pro Milliliter Kulturmedium angesäuert, um ein resorptionsbegünstigendes Milieu zu schaffen.

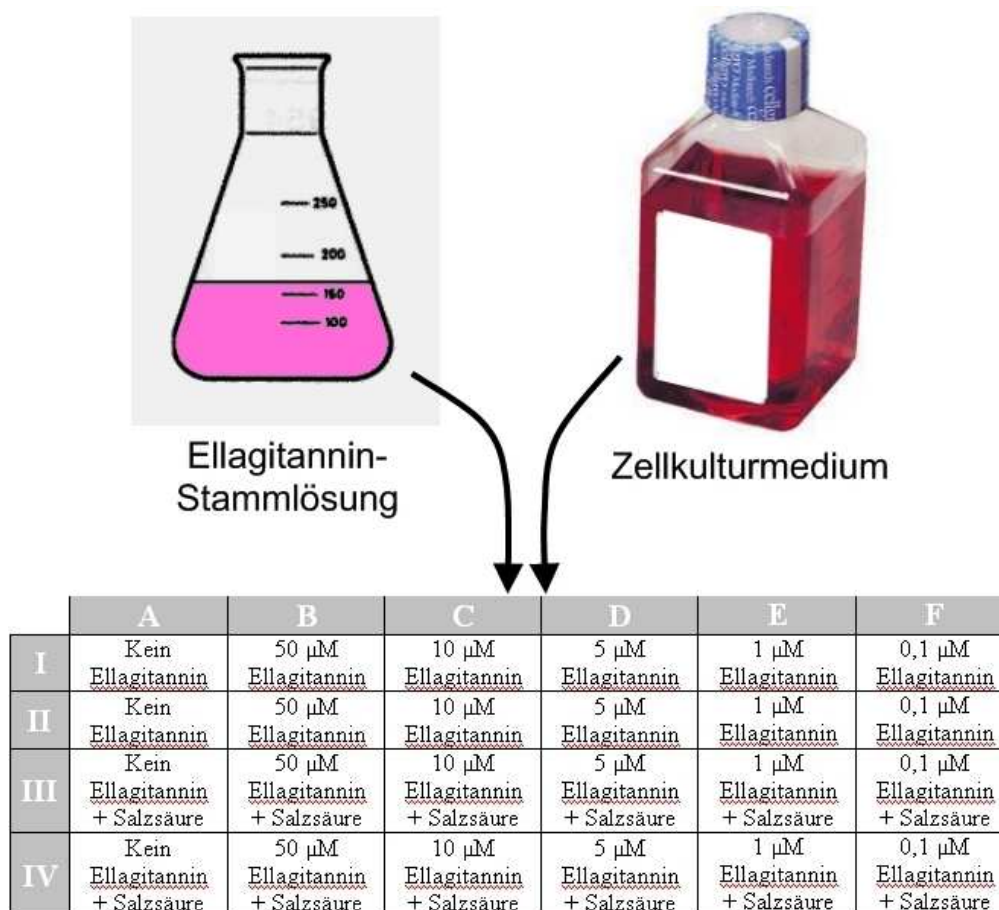


Abbildung 11: Die Anordnung der Gruppen auf der Wellplatte. Jede Gruppe besteht aus zwei Wells zu je vier Knochenplättchen. Dem zu Folge umfasst eine Gruppe 8 Knochenplättchen.

Die Kulturzeit der Osteoblasten und Knochenmarkszellen beträgt fünf bis sechs Tage bei 37°C und 5 % CO₂.

Am fünften Tag der Kultur wird unter sterilen Bedingungen aus jedem Well der Kontrollgruppe ein Knochenplättchen entfernt und in Isopropanol fixiert. Die Plättchen werden 15 Minuten lang in einem Ultraschallbad von anhaftenden Zellen und Silikonresten gereinigt. Anschließend werden die Resorptionsareale

mit Toluidinblau-Lösung angefärbt. Unter einem Auflicht-Mikroskop wird das Ausmaß der aufgetretenen Resorption bewertet und bei zufriedenstellenden Ergebnissen (Resorption jenseits von 1 % der Gesamtfläche in der Kontrollgruppe) die Kultur beendet. Bei negativer Beurteilung des Resorptionsausmaßes wird die Kulturplatte noch einen Tag länger bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Spätestens nach 6 Kulturtagen werden alle Plättchen entnommen, am Ultraschallbad gereinigt und mittels Toluidinblau-Lösung gefärbt.

2.2.1.3 Auswertung des Resorptionsausmaßes

Die weitere Bearbeitung der Plättchen erfolgt mittels eines Auflichtmikroskops unter Verwendung der Imaging-Software Cell[^]F der Firma Olympus.

Reste von Zellen und Färbelösung werden mittels sanften Bürsten unter Einsatz von destilliertem Wasser von den Plättchen entfernt. Anschließend werden von jedem Plättchen zwei Fotos bei zwanzigfacher Vergrößerung angefertigt. Hierbei dienen jeweils die linke, obere Ecke sowie die rechte, untere Kante des Knochenplättchens als Fokus. Auf Grund der beim Zuschnitt des Knochens gewählten Plättchengröße überschneiden sich die Fotos an den zentralen Grenzregionen und können somit zu einem einzigen Gesamtbild zusammengefügt werden. Dieses Bild wird in einer Datenbank abgelegt und dient in weiterer Folge zur Bewertung des Resorptionsausmaßes mittels der in Cell[^]F integrierten Auswertungs-Werkzeuge.

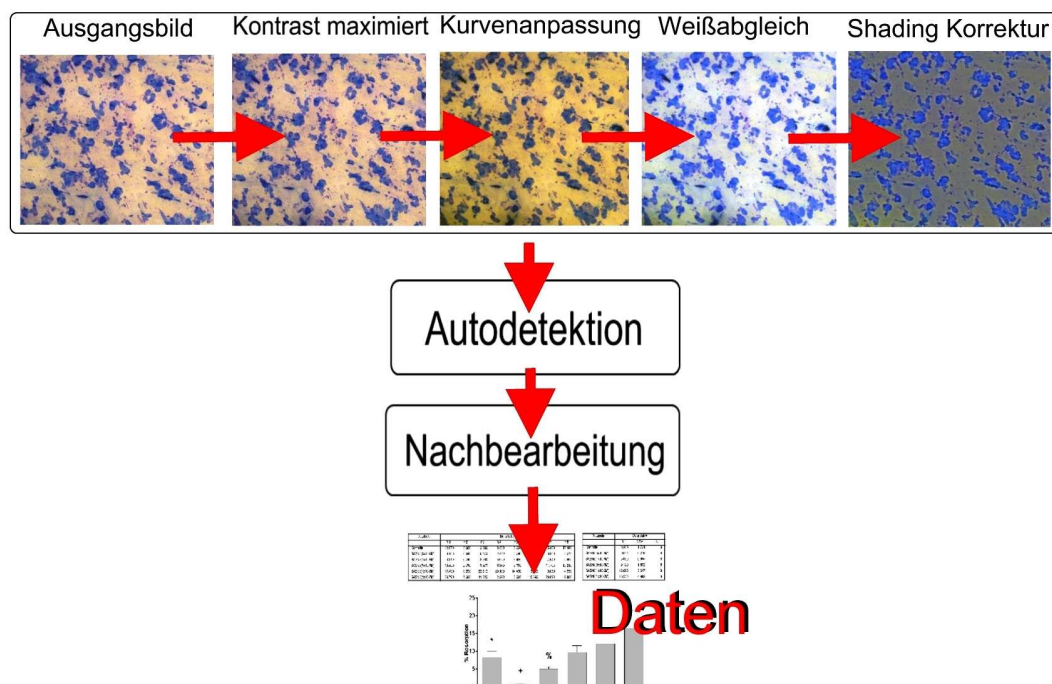


Abbildung 12: Schema der Prozedur der Datengewinnung eines Knochenplättchens.

Die Abbildung des Knochenplättchens wird digital in Cell[^]F überarbeitet um einen möglichst deutlichen Kontrast zwischen blaufärbten Resorptionslakunen und Knochenoberfläche zu erreichen. Das überarbeitete Bild wird an Hand der Farbintensität in eine Graustufen-Abbildung übersetzt. Die Bestimmung der Flächen intensiver Resorption durch die Osteoklasten erfolgt mittels "Automatischer-Auswertungs-Funktion" an Hand der Intensität. Auf Grund der Ähnlichkeit natürlicher Knochenstrukturen (wie zum Beispiel Löchern im Knochen) und osteoklastärer Resorptionsareale ist eine manuelle Nachbearbeitung der automatischen Detektion notwendig. Zum Abschluss wird die Gesamtfläche der Resorptionsareale auf einem Plättchen bestimmt und das Resorptionsausmaß als Anteil an der Gesamtfläche berechnet. Die erhaltenen Werte innerhalb einer Konzentrations-Gruppe werden gemittelt und statistisch auf ihre Signifikanz ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) gegenüber der Kontrollgruppe untersucht. Gruppen, die während des Kulturschrittes bei saurem pH-Wert, das heißt unter Zusatz von Salzsäure, kultiviert wurden, zeigen in der Regel ein deutlich ausgeprägteres

Resorptionsausmaß, weshalb diese Gruppen als unabhängig von den nichtangesäuerten Gruppen betrachtet werden.

2.2.2 Signaltransduktionsuntersuchungen

2.2.2.1 Zell-Kultur

Zur Untersuchung der Einflüsse der Testsubstanzen auf die Signaltransduktion *in vitro* werden RAW-Zellen 264.7 herangezogen. Diese Zellen werden in einem Nährmedium bestehend aus α -MEM mit Glutamax mit einem Anteil von 10 % hitzeinaktiviertem Fetalem Kälberserum und 1 % Penicillin-Streptomycin kultiviert. Um die Bildung von Osteoklasten aus den RAW-Zellen zu stimulieren wird der Hälfte der Wells jeder Zellkulturplatte rekombinantes RANKL in einer Konzentration von 50 ng pro Milliliter zugesetzt.

Pro 6-Well-Zellkulturplatte (kultivierbare Fläche: 9,6 cm²) werden 1,04 Millionen RAW-Zellen pro cm² Kulturfläche ausgesät. Diese werden direkt aus der Zellbank entnommen und unter sterilen Bedingungen des Laminar-Air-Flow aufgetaut. Es wird eine Suspension der RAW-Zellen in α -MEM angefertigt von der in weiterer Folge jeweils 1,5 Milliliter pro Well einer 6-Well Greiner CellStar Zellkulturplatte verwendet werden. Zum Abschluss wird die Hälfte aller Wells im Experiment mit rm-RANKL (7,5 μ l pro Well) versetzt und die Platten werden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach drei Tagen erfolgen ein Austausch des Mediums sowie ein neuerlicher Zusatz von rekombinantem RANKL zu den entsprechenden Gruppen. Danach werden die Platten wiederum bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach mikroskopischem Nachweis mehrkerniger Osteoklasten erfolgt der Zusatz der zu untersuchenden Substanz. Dazu dient eine 100 μ M Stammlösung des jeweiligen Ellagitannins, die durch Lösen eines Pulvers der Probesubstanz in Nährmedium hergestellt wird. Die Zellen werden über einen Zeitraum von zwei Stunden, einer Stunde, fünfzehn Minuten, fünf Minuten oder einer Minute bei 37°C und 5 % CO₂ mit 1,5 Milliliter einer Lösung des Ellagitannins mit einer Konzentration von 10 μ M inkubiert. Die Kontrollgruppe erfährt keinen Substanzzusatz. Nach Ende der Behandlung werden die Wells geleert und mit PBS-ECL gewaschen.

1	1	2	3
	Kontrolle (5 min) + rm-RANKL	Zellen + Medium (1 min) + rm-RANKL + ROBURIN	Zellen + Medium (5 min) + rm-RANKL + ROBURIN
	Kontrolle (5 min) + rm-RANKL	Zellen + Medium (1 min) + rm-RANKL + ROBURIN	Zellen + Medium (5 min) + rm-RANKL + ROBURIN
2	4	5	6
	Zellen + Medium (15 min) + rm-RANKL + ROBURIN	Zellen + Medium (1 h) + rm-RANKL + ROBURIN	Zellen + Medium (2 h) + rm-RANKL + ROBURIN
	Zellen + Medium (15 min) + μ l rm-RANKL + ROBURIN	Zellen + Medium (1 h) + rm-RANKL + ROBURIN	Zellen + Medium (2 h) + μ l rm-RANKL + ROBURIN
3	7	8	9
	Kontrolle (5 min)	Zellen + Medium (1 min) + ROBURIN	Zellen + Medium (5 min) + ROBURIN
	Kontrolle (5 min)	Zellen + Medium (1 min) + ROBURIN	Zellen + Medium (5 min) + ROBURIN
4	10	11	12
	Zellen + Medium (15 min) + ROBURIN	Zellen + Medium (1 h) + ROBURIN	Zellen + Medium (2 h) + ROBURIN
	Zellen + Medium (15 min) + ROBURIN	Zellen + Medium (1 h) + ROBURIN	Zellen + Medium (2 h) + ROBURIN

Tabelle 3: Das Layout des Versuchs auf vier 6-Wellplatten. Die Hälfte der Platten wird mit RANKL (7,5 μ l pro Well) behandelt, um die Bildung von Osteoklasten aus den RAW-Zellen zu stimulieren. Die Konzentration des eingesetzten Roburins beträgt immer 10 μ M. Eine Gruppe besteht aus zwei Wells.

2.2.2.2 Lyse, Proteinextraktion und Proteinassay

In den gewaschenen Wells wird Lysis-Puffer mittels eines Cell-Scrapers verteilt und die Zellen mechanisch vom Boden des Wells abgekratzt. Der gleiche Lysis-Puffer wird für alle Wells einer Gruppe verwendet. Die Zelllysate werden, nach Einwirkzeiten geordnet, in Eppendorf-Gefäßen gesammelt, gevortext, vorhandene Zellfragmente mit 15000 Umdrehungen pro Minute bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand mit den zellulären Proteinen bei -80°C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

Da der Proteingehalt der einzelnen Gruppen variieren kann, für die Auswertung des Western-Blots aber gleiche Proteinkonzentrationen in den Taschen des Elektrophorese-Gels notwendig sind, wird ein Teil des Zelllysates jeder Gruppe einer Protein-Bestimmung unterzogen. Zur Bestimmung des Proteingehaltes dient das *DC Protein-Assay-Kit* der Firma BioRad. Der Nachweis basiert auf der Reaktion zwischen den enthaltenen Proteinen und Kupfer (in Form von Kupfertartrat) bei alkalischem pH-Wert sowie der anschließenden Reduktion von Folins-Reagens durch die Kupfertartrat-behandelten Proteine. Durch die Reduktion kommt es zur Abspaltung von 1, 2 oder 3 Sauerstoffatomen des Folins-Reagens wodurch es zur Bildung verschiedener, blaugefärbter Verbindungen kommt (Absorptionsmaximum: 750 nm).

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt auf einer Mikrotiterplatte in Form einer Doppelbestimmung. Der endgültige Wert entspricht dem Mittelwert beider Messungen. Als Leerwert dient der Absorptionswert des reinen Lysis-Puffers. Zur Erstellung der Eichgerade dienen BSA-Stammlösungen variierender Konzentration. Zur Durchführung des Assay werden zunächst fünf Mikroliter des Zelllysates im Verhältnis 1 zu 6 mit Frackelton-Puffer verdünnt, da die Proteinkonzentration ansonsten oberhalb der Eichkurve liegen würde. Anschließend wird durch Lösung der Detergens-Lösung Reagenz S in Reagenz A (alkalische Kupfertartrat-Lösung) die Lösung A' hergestellt. Pro Well einer 96er-Well-Platte werden fünf Mikroliter des Lysates, 25 Mikroliter der Lösung A' und 200 Mikroliter des Reagenz B (Folins-Reagens) verwendet. Die Standards, der Lysis-Puffer ohne Lysat sowie die Zelllysate der einzelnen Einwirkzeiten werden nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur bei 690 nm vermessen und der Mittelwert der Messungen gebildet. Auf Grund des initialen Verdünnungsschrittes ist es notwendig die gemessene Konzentration mit dem Faktor sechs zu multiplizieren, um die tatsächlich enthaltene Proteinkonzentration zu ermitteln.

2.2.2.3 SDS-Gel-Elektrophorese

Zur Auftrennung der isolierten, zellulären Proteine dient eine senkrecht ablaufende SDS-Gel-Elektrophorese. Das verwendete SDS-Polyacrylamid-Gel besteht aus zwei Abschnitten, dem Stacking-Gel und dem Running Gel.

Die großen Proteinmoleküle werden mit β -Mercaptoethanol fragmentiert und einheitlich geladen, um eine Trennung nach dem Molekulargewicht zu ermöglichen.

Das Stacking-Gel wird mit 15 Taschen zur Aufnahme der Proteinlysate gegossen. Eine Tasche fasst maximal 30 μ l Probenlösung. Nach dem Waschen der Taschen mit 1x Running-Puffer wird die Elektrophorese-Apparatur zusammengesetzt und mit den vorbereiteten Proben beladen.

Zur Probenvorbereitung werden die Zelllysate mit 1x und 4x Sample-Puffer versetzt, fünf Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend zentrifugiert. 12 der Geltaschen werden mit jeweils 24 Mikroliter der Probensubstanz befüllt. Die letzte Tasche enthält zehn Mikroliter SecBlue Plus2 Restained Standard als Molekulargewichtsmarker.

Die Elektrophorese wird mit 25 Milli-Ampere Stromstärke und 300 Volt begonnen. Nach dem Übergang der Proben ins Running-Gel wird die Stromstärke auf 35 Milli-Ampere angehoben. Die Elektrophorese wird fortgesetzt, bis die Farbstofffront das untere Ende des Gels beinahe erreicht hat.

2.2.2.4 Transfer

Der Transfer dient der Übertragung der Protein-Banden vom Elektrophorese-Gel auf eine Nitrocellulosemembran um eine nachfolgende Aufarbeitung und Detektion zu erleichtern. Das Stacking-Gel mit den Proteinbanden wird in die vorbereitete Transferkassette überführt und der Transfer erfolgt bei 4° Celsius, einer Spannung von 100 Volt und 350 Milli-Ampere. Der Vorgang dauert eine Stunde.

Der Erfolg des Transfers wird mittels Anfärben mit 0,2 %iger Ponceaurot-Lösung überprüft. Anschließend wird die Nitrocellulose gewaschen und die restlichen Bindungsstellen auf der Membran mit Blocking Solution blockiert.

2.2.2.5 Western-Blot

Mittels "Western-Blot"-Methode wird das Vorliegen einzelner Proteine nachgewiesen und deren Konzentration grob quantifiziert. Das „Western-Blot“-Verfahren beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen einem primären Immunglobulin und einem sekundären Antikörper von Kaninchen oder Maus, welcher wiederum mit einer Hydroperoxidase konjugiert vorliegt. Der primäre Antikörper wird in einer Konzentration von 1:1000 eingesetzt und bindet spezifisch an das nachzuweisende Protein, wodurch die Selektivität der Methode bedingt wird. Der sekundäre Antikörper hingegen ist speziesspezifisch. Die Komplexbildung mit dem sekundären Immunglobulin ist also von der Herkunft des primären Antikörpers und nicht vom Typ des Proteins abhängig. Diese Immunglobuline stammen von Kaninchen oder Maus und werden in Konzentrationen von 1:5000 eingesetzt.

Monoklonaler Anti- β -Aktin-Antikörper

- Sigma (Product Number A2228)
- Monoklonaler Antikörper aus Mäusen
- Reagiert spezifisch mit β -Aktin von Mensch, Rind, Schaf, Schwein, Kaninchen, Katze, Hund, Maus, Ratte, Meerschweinchen, Huhn, Karpfen, Blutegel und Fruchtfliege.
- Zusammensetzung : 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,4, 15 mM Natriumazid

Phospho Akt (Ser473) (D9E)-Antikörper

- Cell Signaling Technology (Kat.Nr. #4060)
- Monoklonaler Antikörper aus Kaninchen
- Reagiert spezifisch mit Serin⁴⁷³ phosphoryliertem Akt
- Zusammensetzung : 10 mM Natrium-HEPES (pH 7,5), 150 mM NaCl, 100 μ g/ml BSA, 50 % Glycerin, weniger als 0.02 % Natriumazid

Polyklonaler Anti-Src [pY⁴¹⁸] phosphospezifischer-Antikörper, unkonjugiert

- Biosource (Catalog Number 44-660G)
 - Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen
 - Reagiert spezifisch auf Tyrosin⁴¹⁸ phosphoryliertes Src von Mensch, Maus und Huhn.
 - Zusammensetzung : Dulbecco`s Phosphatpuffer (ohne Mg²⁺ und Ca²⁺) pH 7,3 (+/- 0,1), 50 % Glycerin, 1,0 mg/ml BSA
-

Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) E10-Antikörper

- New England BioLabs Inc. (Kat.Nr. #9106S)
 - Monoklonaler Antikörper aus Mäusen
 - Reagiert spezifisch auf Threonin202/ Tyrosin204 biphosphorylierte p44 und p42 MAP Kinase von Mensch, Ratte, Maus und Hamster
 - Zusammensetzung : 10 mM Natrium-HEPES (pH 7,5), 150 mM NaCl, 100 µg/ml BSA, 50 % Glycerin
-

Phospho NF-κB p65 (Ser536) (93H1)-Antikörper

- Cell Signaling Technology (Kat.Nr. #3033)
 - Monoklonaler Antikörper aus Kaninchen
 - Reagiert spezifisch mit Serin⁵³⁶ phosphoryliertem NF-κB p65
 - Zusammensetzung : 10 mM Natrium-HEPES (pH 7,5), 150 mM NaCl, 100 µg/ml BSA, 50 % Glycerin, weniger als 0,02 % Natriumazid
-

Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) -Antikörper

- Cell Signaling Technology (Kat.Nr. #9211)
 - Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen
 - Reagiert spezifisch auf Threonin¹⁸⁰/ Tyrosin¹⁸² biphosphorylierte p38 MAP Kinase
 - Zusammensetzung : 10 mM Natrium-HEPES (pH 7,5), 150 mM NaCl, 100 µg/ml BSA, 50 % Glycerin
-

Tabelle 4: Die verwendeten primären Antikörper

Anti-Mouse IgG HRP-Konjugat

- Promega (Kat.Nr W4021)
 - Immunglobulin aus Ziegenserum, konjugiert an Peroxidase
 - Reagiert mit allen IgGs der Maus sowie mit den leichten Ketten anderer Maus-Immunglobuline
 - Zusammensetzung : 0,02 M Natrium-Phosphat pH 7,6, 0,25 M NaCl, BSA und 0,01 % Thiomersal
-

Anti-Rabbit IgG HRP-Konjugat

- Promega (Kat.Nr W4021)
 - Immunglobulin (FC) aus Ziegenserum, konjugiert an Peroxidase
 - Reagiert mit den schweren Ketten von IgG von Kaninchen. Keine Reaktion mit leichten Ketten anderer Kaninchen-Immunglobuline.
 - Zusammensetzung : 0,02 M Natrium-Phosphat pH 7,6, 0,25 M NaCl, BSA und 0,01 % Thiomersal
-

Tabelle 5: Die verwendeten sekundären Antikörper

Praktische Durchführung:

Die Nitrocellulose-Membran wird über Nacht bei 4° Celsius mit der Lösung des primären Antikörpers inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen erfolgt die einstündige Inkubation mit einer Lösung des sekundären Antikörpers bei Raumtemperatur.

2.2.2.6. Methoden zur Auswertung des Western-Blot

Der Nachweis der markierten Proteine erfolgt mit dem *ECL Western Blotting Detection Reagents*-Systems der Firma GE Healthcare. Dieser nicht-radioaktive Nachweis beruht auf der Belichtung eines Röntgenfilms durch Licht, das in Folge von Chemolumineszenz emittiert wird.

Die gewaschene Membran wird mit 0,125 ml der Mischung beider Detection-Reagenzien pro cm² Membran behandelt, in eine Photokassette transferiert und die auftretende Chemolumineszenz mit einem Röntgenfilm festgehalten.

2.2.2.7 Stripping und Reprobing

Um mehrere Proteine auf einem einzigen Blot nachweisen zu können ist es notwendig den bereits auf der Nitrocellulose befindlichen Antikörper-Komplex zu entfernen. Die Membran wird gewaschen, mit 50 ml Stripping-Puffer sowie 350 µl β -Mercaptoethanol versetzt und 30 Minuten bei 50° Celsius und 100 rpm geschüttelt. Nach dem Stripping werden unspezifische Membranbindungsstellen erneut mit Blocking Solution blockiert.

	Antikörper auf Blot A	Antikörper auf Blot B
Ausgangszustand	Phospho-p44/42 MAP Kinase	Phospho-p38 MAP Kinase
1.Stripping	Phospho-Akt	Phospho NF- κ B p65
2.Stripping	Anti- β -Aktin	Phospho-Anti-Src [pY ⁴¹⁸]
3.Stripping	Phospho Akt oder Phospho-Anti-Src [pY ⁴¹⁸]	

Tabelle 6: Reihenfolge des Aufbringens der primären Antikörper

3.Resultate

3.1. Wichtige Hinweise zu den Resultaten

3.1.1 Ermittlung des Resorptionsausmaßes

Um eine Standardisierung des Resorptionsausmaßes bei unterschiedlicher Größe der Knochenplättchen zu erreichen wird die Fläche der Resorptionslakunen in Prozent resorbierter Knochenfläche angegeben. Dadurch werden die Ergebnisse innerhalb einer Konzentrationsgruppe sowie unter den einzelnen Gruppen vergleichbar. Folgende mathematische Formel wurde bei allen durchgeführten Pit-Assays zur Ermittlung des Resorptionsausmaßes herangezogen.

$$\text{Resorptionsausmaß \%} = \frac{\sum \text{Fläche}_{\text{Resorptionslakune}}}{\text{Fläche}_{\text{Knochenoberfläche}}}$$

3.1.2 Ansäuern der Co-Kultur

Da Hinweise darauf bestehen, dass das Ansäuern der Co-Kultur zu einer Erhöhung der Osteoklastenzahl beiträgt wurde der Einfluss des Zusatzes von Salzsäure zur Kultur im Vorfeld der Arbeiten mit den Ellagitanninen untersucht.

In 6-Wellplatten wurde eine Osteoblasten-Osteoklasten-Co-Kultur in einem Kulturmedium der Firma Bio-Whittaker angesetzt. Am dritten Tag nach Aussaat der murinen Knochenmarkszellen erfolgte, im Zuge eines Mediumwechsels, das Ansäuern eines Teils der Wells mit 2,3 µl 5N Salzsäure pro Milliliter Kulturmedium. Der Säurezusatz senkte den pH-Wert der Kultur auf 6,7. Die Well-Platten wurden bis zum Abschluss der Kultur im Kulturschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Um das Auszählen der gebildeten mehrkernigen Osteoklasten zu vereinfachen erfolgte eine Markierung mittels TRAP-Färbung. Das Auszählen der Zellen erfolgte manuell unter Zuhilfenahme eines Cell-Counters wobei nur Zellen mit drei oder mehr Zellen berücksichtigt wurden.

Die Resultate dieser Voruntersuchungen (Ergebnisse werden nicht angegeben) bestätigten die Annahme, dass es bei einem pH-Wert von 6,7 zu einer gesteigerten Bildung von Zellen der Osteoklastenzelllinie kommt. Deswegen wurde beschlossen die Wirkung der Roburine A und D auch unter, die Osteoklastenbildung begünstigendem, niedrigerem pH-Wert der Co-Kultur zu Untersuchen. Dazu wurde die Hälfte aller Wells in einem Experiment zum Zeitpunkt der Substanzzugabe mit 2,3 µl 5N Salzsäure pro Milliliter Kulturmedium versetzt.

3.2. Roburin A

3.2.1. Ergebnisse des Pit-Assay

3.2.1.1. Resorptionsquoten bei Standard-pH der Co-Kultur

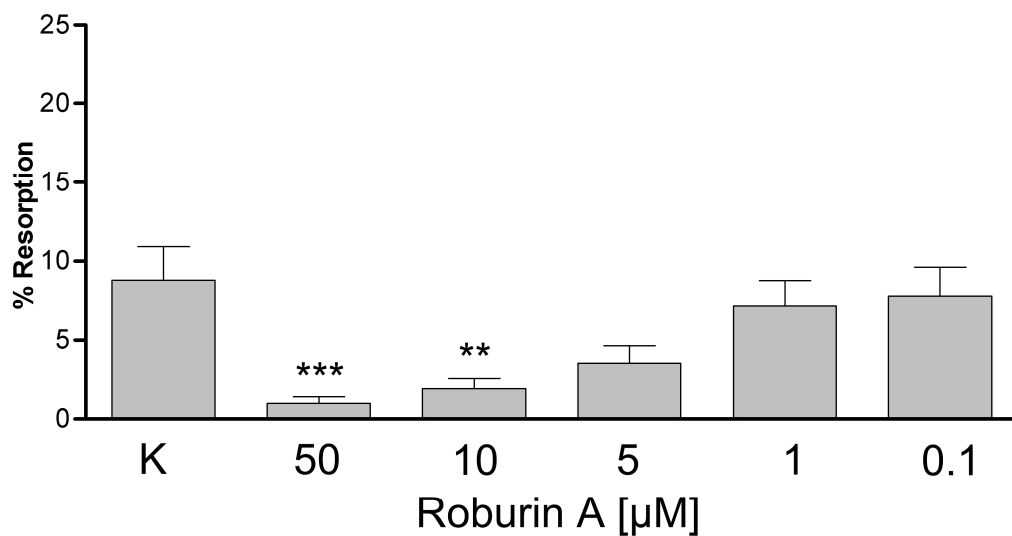


Abbildung 13: Die Abbildung zeigt den Einfluss von Roburin A unterschiedlicher Konzentrationen auf die Resorptionstätigkeit der Osteoklasten, dargestellt als prozentueller Anteil der Fläche der Resorptionslakunen an der gesamten Oberfläche eines Knochenplättchens. Angegeben sind die Ergebnisse als Mittelwerte $\pm$ *standard error of the mean*. Die eingesetzten Konzentrationen von Roburin A waren 50 µM, 10 µM, 5 µM, 1 µM sowie 0,1 µM. Roburin A bewirkte eine dosisabhängige Hemmung des Knochenabbaus zwischen 50 und 1 µM. Das Maximum der Hemmung lag bei 11 % der Resorption in der Kontrollgruppe.

*** $p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe [K]

** $p < 0,01$ gegenüber der Kontrollgruppe [K]

Konzentration Roburin A	Resorptionsausmaß in Prozent							
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8
Kontrolle	11.430	3.640	6.470	10.060	1.320	4.230	14.830	18.560
50 µM	0.310	1.670	0.040	3.540	0.180	0.080	1.690	0.480
10 µM	1.060	3.110	1.930	0.950	0.830	1.250	5.790	1.180
5 µM	1.020	2.650	3.480	4.560	1.160	1.930	10.790	2.870
1 µM	0.780	3.330	4.610	14.700	8.230	10.290	10.920	4.370
0.1 µM	12.270	3.800	11.510	14.700	10.190	0.410	1.350	7.880

Tabelle 7: Angeführt sind die ermittelten Resorptionsquoten der Knochenplättchen der verschiedenen Konzentrations-Gruppen. Y1 bis Y8 charakterisiert die unterschiedlichen Plättchen einer Gruppe. Eine Gruppe umfasst acht annähernd gleich große, quadratische Knochenplättchen. Innerhalb der Gruppe wurden alle Knochenplättchen mit der gleichen Konzentration an Roburin A behandelt. Die Messwerte sind als Anteil der Resorptionslakunen an der gesamten Knochenoberfläche in Prozent angegeben und errechnen sich durch die, unter 3.1.1. angegebene, Formel.

3.2.1.2. Untersuchungen zur Säurestabilität von Ellagitanninen am Beispiel von Roburin A

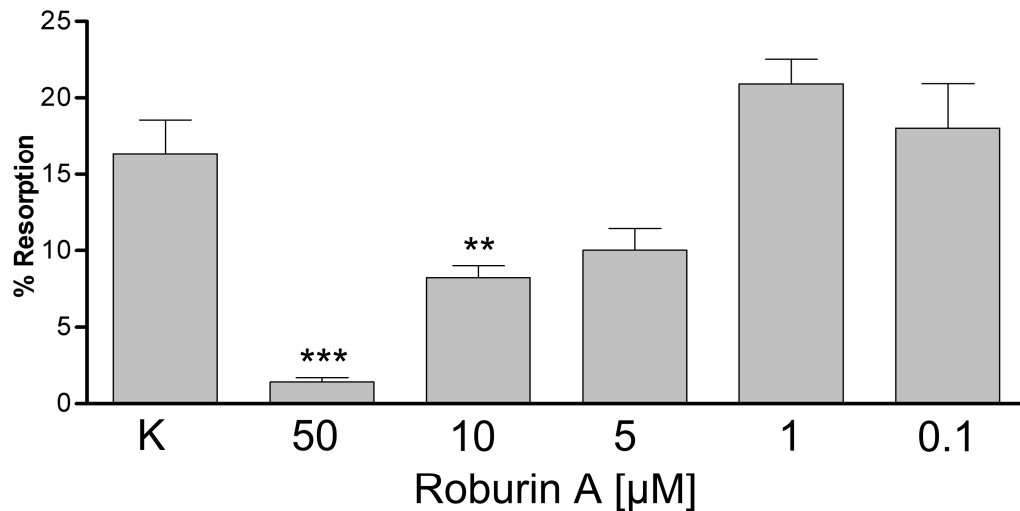


Abbildung 14: Die Abbildung zeigt das Ausmaß der Hemmwirkung von Roburin A unterschiedlicher Konzentrationen auf den osteoklastären Knochenabbau bei ausgeprägt saurem pH-Wert der Kultur. Roburin A wurde in Konzentrationen von 50 µM, 10 µM, 5 µM, 1 µM und 0,1 µM eingesetzt. Roburin A, in der höchsten Konzentration von 50 µM, führt zu einer fast vollständigen Hemmung des Knochenabbaus. Das Maximum der Hemmung liegt bei 8,5 % der Resorption in der Kontrollgruppe. Bei einer Konzentration von 0,1 µM ist keine Hemmung mehr feststellbar.

*** $p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe [K]

** $p < 0,01$ gegenüber der Kontrollgruppe [K]

Konzentration Roburin A	Resorptionsausmaß in Prozent							
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8
Kontrolle	25.650	23.040	15.150	8.660	6.930	17.150	17.350	16.530
50 μ M	1.070	1.440	1.610	0.820	1.200	0.830	0.770	3.320
10 μ M	5.910	6.930	6.800	6.260	12.490	9.800	8.050	9.190
5 μ M	9.350	4.670	16.610	12.730	6.940	13.610	9.910	6.470
1 μ M	22.270	28.070	12.400	18.460	20.520	23.240	21.980	20.320
0.1 μ M	23.740	30.700	17.780	12.460	20.760	8.770	11.990	

Tabelle 8: Die Tabelle gibt die ermittelten Messwerte für die Resorptionsfläche als Anteil an der Gesamtoberfläche eines Knochenplättchens in Prozent an. Y1 bis Y8 repräsentieren hierbei jeweils ein Plättchen aus der jeweiligen Gruppe. Innerhalb einer Gruppe wurden alle Knochenplättchen mit einer identen Ellagitannin-Konzentration behandelt. Eine Gruppe umfasst generell acht Knochenplättchen. Nur die Gruppe mit 0,1 μ M Roburin A setzt sich aus sieben Plättchen zusammen.

3.2.1.3 Vergleich der Hemmwirkung bei Standard-pH sowie nach Ansäuern der Kultur

Sowohl bei gewöhnlichem pH-Wert (siehe 3.2.1.1.), als auch nach dem Ansäuern der Kultur (siehe 3.2.1.2.) mit 2,3 μ l 5N Salzsäure pro ml Kulturmedium ist eine dosisabhängige Hemmung des osteoklastären Knochenabbaus unter Behandlung mit Roburin A feststellbar. In beiden Fällen tritt die stärkste Hemmwirkung bei einer Konzentration von 50 μ M des Ellagitannins auf. Trotz der vergleichsweise höheren Resorptionstätigkeit der Osteoklasten in der mit Salzsäure behandelten Kultur ist eine vergleichbare Hemmung des Knochenabbaus bei beiden Versuchen feststellbar.

3.2.2 Ergebnisse der Signaltransduktionsuntersuchungen

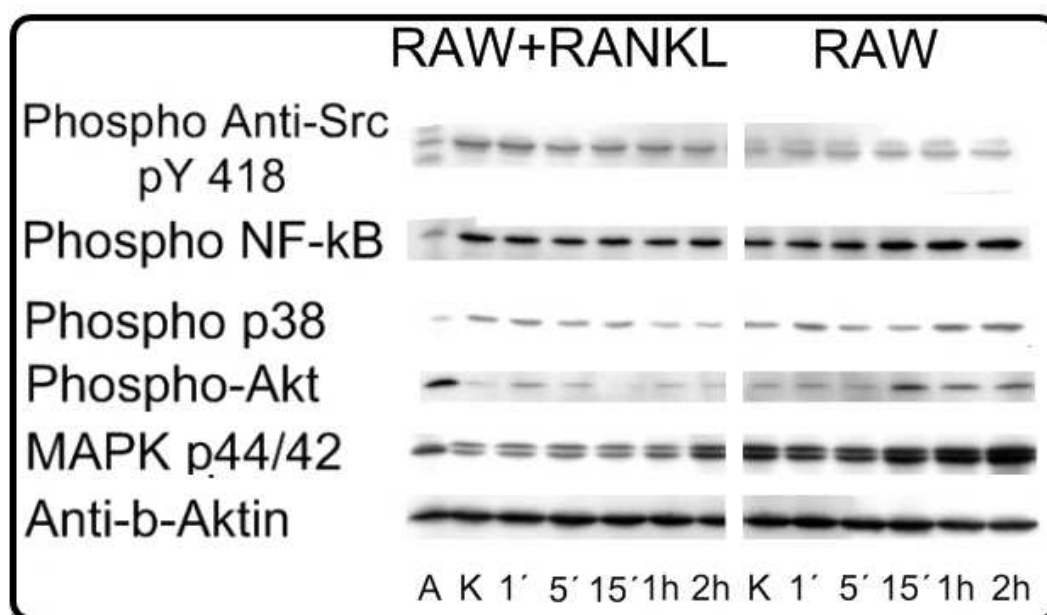


Abbildung 15: Westernblot-Analyse der Roburin A-Wirkung auf RAW 264.7 Zellen. Untersucht wurde der Einfluss von Roburin A bei einer Konzentration von 10 μ M auf die Phosphorylierung der Signaltransduktionsproteine p44 und p42 MAP Kinase, Akt, Beta-Aktin, p38 MAP-Kinase, NF- κ B p65 sowie Src. Die Zelllinie A431 [A] dient zu Referenzzwecken. Die auf die Referenzzelllinie A431 folgenden sechs Banden repräsentieren die Proteinladung der, durch Behandlung mit rm-RANKL aus RAW 264.7-Zellen generierten, Osteoklasten. Diese Banden umfassen eine Kontrollgruppe [K] zu Vergleichszwecken sowie fünf Gruppen mit unterschiedlich langen Einwirkzeiten Roburin A: eine Minute [1'], fünf Minuten [5'], 15 Minuten [15'], 60 Minuten [1h] sowie 120 Minuten [2h]. Der zweite Block von Banden zeigt den Anteil von phosphorylierten Proteinen in unbehandelten RAW 264.7 Zellen.

Phosphorylierte Proteine	RAW + RANKL						RAW					
	K	1'	5'	15'	1 h	2h	K	1'	5'	15'	1 h	2h
Anti-Src pY418	Ø	•	▼	•	•	▼	Ø	•	•	▲	▲	▲
NF-κB	Ø	•	•	•	•	•	Ø	•	•	▲	▲	▲
p-38 MAPK	Ø	•	•	•	▼	▼	Ø	▲	•	•	▲	▲
Akt	Ø	▲	▲	▼▼	•	•	Ø	•	•	▲▲	▲	▲
p44/42 MAPK	Ø	•	•	•	•	▲▲	Ø	•	•	•	•	▲▲
Anti-β-Aktin	Ø	•	•	•	•	•	Ø	•	•	•	•	•

Tabelle 9: Zusammenfassung der Ergebnisse der Signaltransduktions-experimente mit Roburin A. Die Auswertung der Banden erfolgte qualitativ. Alle Aussagen sind in Relation zur Kontrollgruppe des jeweiligen Zelltyps zu verstehen und geben keine absoluten Verhältnisse wieder.

In der Gruppe der, aus RAW 264.7-Zellen generierten, Osteoklasten liegen **p44 und p42 MAP-Kinase** überwiegend nach 120 Minuten phosphoryliert vor. Die Konzentration an phosphorylierten **Akt** ist in den ersten fünf Minuten der Behandlung mit Roburin A leicht erhöht und fällt nach 15 Minuten stark ab. Nach einer Stunde ist die Konzentration des phosphorylierten Akt-Proteins vergleichbar mit der Kontrollgruppe. Der Anteil an phosphorylierter **p38 MAP-Kinase** nimmt nach einer Stunde der Behandlung mit dem Ellagitannin-Dimer rapide ab. Dieser Zustand ist auch nach zweistündiger Behandlung feststellbar. In Bezug auf den nukleären Transkriptionsfaktor **NF-κB p65** zeigen sich über die gesamte Behandlungsdauer mit der Substanz keine Auffälligkeiten im Phosphorylierungsmuster. Nach fünf Minuten und 120 Minuten liegt ein geringerer Anteil der **Src-Kinase** in phosphorylierter Form vor. Zu Beginn der Inkubation mit Roburin A sowie in der Zeit zwischen fünf Minuten und 2 Stunden entspricht die Konzentration an phosphorylierten Protein jener der Kontrollgruppe. **β-Aktin** liegt über den gesamten Verlauf der Behandlung mit Roburin A in konstantem Ausmaß phosphoryliert vor.

In den Gruppen der unbehandelten RAW-Zellen präsentiert sich die Situation teilweise gravierend unterschiedlich zu den rm-RANKL behandelten Zellen. Nach einer zweistündigen Behandlung mit Roburin A liegen die **MAP-Kinasen p44 und p42** weitaus stärker phosphoryliert vor als die Kontrollgruppe. Phosphoryliertes **Akt**-Protein findet sich vor allem nach 15 Minuten in großen Mengen. Auch nach einer und zwei Stunden Behandlung mit Roburin A ist der Anteil an aktiviertem Akt erhöht. Aktivitätsspitzen der **p38 MAP Kinase** finden sich nach einer Minute sowie nach einer und zwei Stunden Ellagitannin-Behandlung. **NF- κ B p65** erfährt nach 15 Minuten, einer sowie zwei Stunden Behandlung mit Roburin A eine Steigerung des Phosphorylierungsgrades. Auch der phosphorylierte Anteil der **Src-Kinase** liegt nach 15 Minuten, einer und zwei Stunden über dem Niveau der Kontrollgruppe. Bei den unbehandelten RAW-Zellen kommt es zu keiner Veränderung des Phosphorylierungsmaßes des **β -Aktins**.

3.3 Roburin D

3.3.1. Ergebnisse des Pit-Assay

3.3.1.1. Resorptionsquoten bei Standard-pH der Co-Kultur

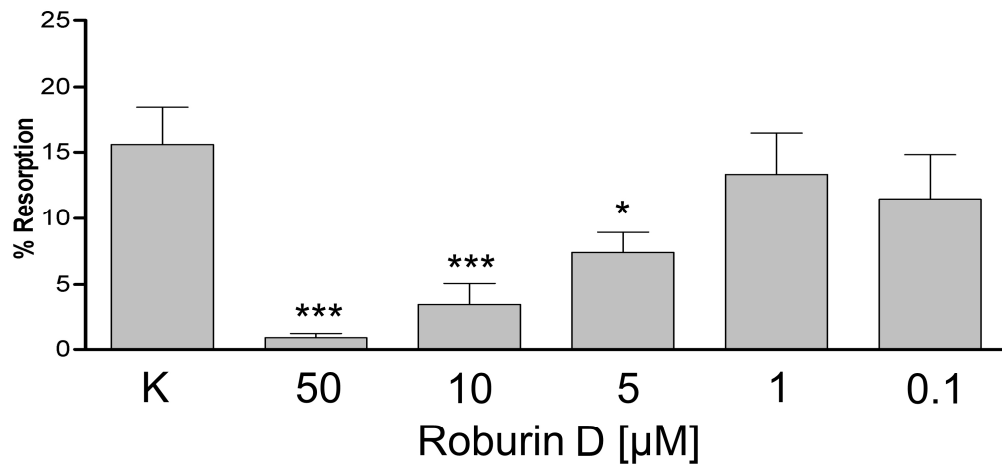


Abbildung 16: Die Abbildung zeigt die Hemmwirkung von Roburin D unterschiedlicher Konzentrationen auf den osteoklastären Knochenabbau. Roburin D wurde in Konzentrationen von 50 µM, 10 µM, 5 µM, 1 µM und 0,1 µM eingesetzt. Angegeben werden die Mittelwerte der Gruppen $\pm$ *standard error of the mean*.

Roburin D bewirkt eine dosisabhängige Hemmung der Osteoklastentätigkeit zwischen 5 und 50 µM. Die maximale Hemmung lag bei 5,8 % der Resorption der Kontrollgruppe.

*** $p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe [K]

* $p < 0,05$ gegenüber der Kontrollgruppe [K]

Konzentration Roburin D	Resorptionsausmaß in Prozent							
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8
Kontrolle	13.490	23.360	24.820	16.100	13.560	5.390	4.440	23.540
50 μ M	0.130	0.090	1.100	2.060	0.360	2.370	0.970	0.190
10 μ M	0.850	1.700	3.900	14.160	2.920	2.330	1.700	0.350
5 μ M	7.110	6.230	9.950	5.370	2.090	5.990	16.620	6.000
1 μ M	4.930	10.090	6.800	30.060	19.340	5.430	11.390	18.780
0.1 μ M	3.790	3.970	8.320	14.530	27.060	24.100	6.680	3.390

Tabelle 10: Die Tabelle zeigt die gemessenen Resorptionswerte für jedes Knochenplättchen einer Gruppe. Jede der Gruppen umfasst acht Knochenplättchen. Das Resorptionsausmaß wurde relativ zur gesamten Oberfläche eines Knochenplättchens bestimmt, gemäß der Formel unter 3.1.1.

3.3.1.2. Untersuchungen zur Säurestabilität von Ellagitanninen am Beispiel von Roburin D

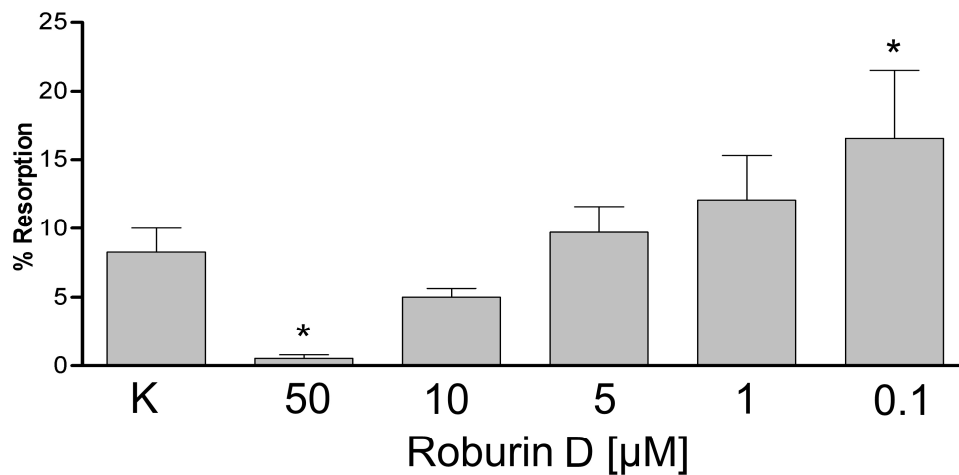


Abbildung 17: Die Abbildung zeigt den Effekt von Roburin D unterschiedlicher Konzentrationen auf den osteoklastären Knochenabbau bei saurem pH-Wert der Kultur. Roburin D wurde in Konzentrationen von 50 µM, 10 µM, 5 µM, 1 µM sowie 0,1 µM eingesetzt. Roburin D der Konzentration von 50 µM führt zu einer fast vollständigen Hemmung des Knochenabbaus durch die Osteoklasten. Das Maximum der Hemmung liegt bei 6,3 % der Resorption in der Kontrollgruppe. Ab einer Konzentration von 5 µM war keine Hemmung mehr feststellbar. Es war sogar mehr Knochenabbau zu verzeichnen als in der Kontrollgruppe.

* $p < 0,05$ gegenüber der Kontrollgruppe [K]

Konzentration Roburin D	Resorptionsausmaß in Prozent							
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8
Kontrolle	12.870	5.060	3.380	10.580	5.220	6.310	5.450	17.440
50 µM	0.130	0.340	0.470	2.440	0.240	0.140	0.060	0.370
10 µM	3.310	6.740	3.900	5.060	3.420	3.030	7.640	6.900
5 µM	19.800	2.760	6.670	8.340	5.000	13.280	11.700	10.210
1 µM	17.490	9.290	26.510	20.190	14.430	3.860	0.050	4.950
0.1 µM	33.790	5.600	41.020	12.290	3.600	5.390	20.890	9.860

Tabelle 11: Die ermittelten Resorptionsdaten aller Knochenplättchen des Versuchs finden sich in oben angeführter Tabelle nach Gruppen sortiert. Wie bei den Versuchen ohne Säurezusatz wurde auch hier das Resorptionsausmaß als prozentueller Anteil an der Gesamtoberfläche eines Knochenplättchens bestimmt. Die Formel für die Berechnung ist unter 3.1.1. zu finden.

3.3.1.3. Erkenntnisse, die durch das Ansäuern der Kultur gewonnen wurden

Roburin D zeigt, unabhängig vom pH-Wert des Kulturmediums, bei der höchsten Konzentration von 50 µM die stärkste Hemmwirkung. Sowohl bei normalem pH-Wert (3.3.1.1.) als auch bei saurem pH (3.3.1.2.) des Kulturmediums liegt die maximale Hemmung um 6 % des Knochenabbaus in der Kontrollgruppe.

3.3.2. Ergebnisse der Signaltransduktionsuntersuchungen

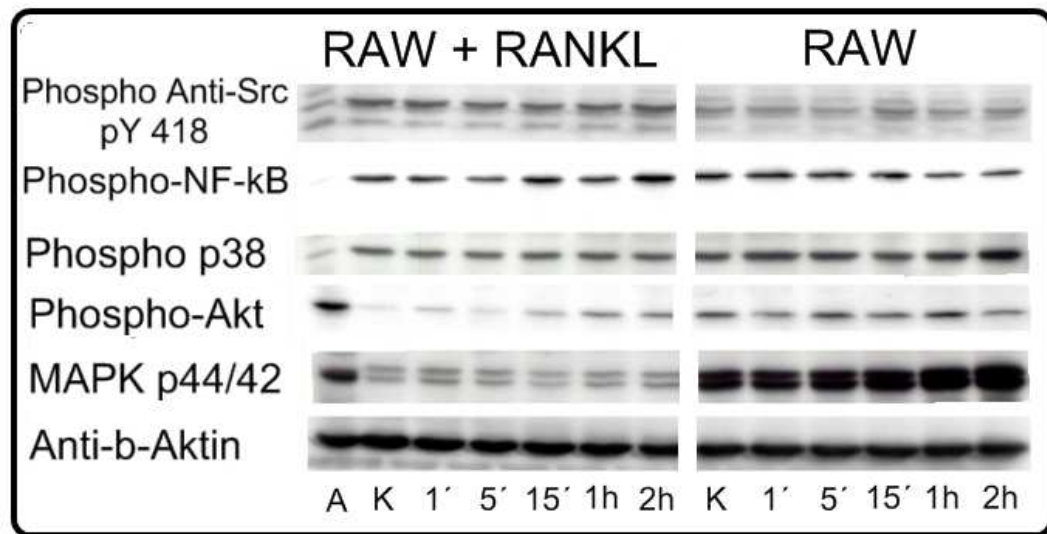


Abbildung 18: Diese Abbildung fasst die Veränderungen auf zellulärer Ebene durch Behandlung von Zellen der RAW 264.7 Zelllinie mit einer Roburin D Lösung der Konzentration 10 μ M zusammen. Ein Teil der RAW-Zellen wurde während der Zellkulturphase mit rm-RANKL zu mehrkernigen Osteoklasten kultiviert.

Als interner Standard wurde die Zelllinie A431 [A] verwendet. Die darauf folgende Kontrollgruppe [K] wurde nicht mit Roburin D behandelt und dient als Referenz für die restlichen Gruppen. Fünf weitere Banden zeigen die Auswirkungen unterschiedlich langer Einwirkzeiten (1 Minute, 5 Minute, 15 Minuten, 1 Stunde, 2 Stunden) von 10 μ M Roburin D auf die Phosphorylierung wesentlicher zellulärer Proteine der RAW 264.7 Zellen.

Phosphoryliertes Protein	RAW + RANKL						RAW					
	K	1'	5'	15'	1h	2h	K	1'	5'	15'	1h	2h
Anti-Src pY418	Ø	•	▼	▼	•	•	Ø	•	•	•	•	▼
NF-KB	Ø	•	▼	•	•	▲	Ø	•	•	•	▼	▼
p-38 MAPK	Ø	•	•	•	•	•	Ø	•	•	•	•	▲
Akt	Ø	▲	▼	▲	▲▲	▲▲	Ø	▼	•	•	•	▼
p44/42 MAPK	Ø	•	•	•	•	•	Ø	•	•	•	▲▲	▲▲
Anti-β-Aktin	Ø	•	•	•	•	•	Ø	•	•	•	•	•

Tabelle 12: Die Abbildung fasst die Ergebnisse der Einflüsse auf die Proteinphosphorylierung durch Roburin D zusammen. Die Beurteilung der Ergebnisse erfolgte unter qualitativen Gesichtspunkten relativ zur Kontrollgruppe. Ein Punkt in der Abbildung bedeutet, dass keine oder nur sehr geringe Veränderungen zur Kontrollgruppe feststellbar waren. Ein Pfeil kennzeichnet eine merkbare Verschiebung des Phosphorylierungsgrades. Ein Doppelpfeil weist auf eine deutlich erkennbare Änderung gegenüber der Kontrollgruppe hin.

Bei den mittels rm-RANKL gewonnen Osteoklasten liegen die **p44 und p42 MAP-Kinasen** über den gesamten Untersuchungszeitraum in vergleichbarem Ausmaß zur Kontrollgruppe phosphoryliert vor. **Akt** liegt nach einer und fünf Minuten stärker phosphoryliert vor. In dem Zeitraum zwischen 60 und 120 Minuten liegt das Protein sogar sehr viel stärker phosphoryliert vor als die Kontrollgruppe. Nach fünfminütiger Behandlung mit Roburin D tritt eine Abnahme der Phosphorylierung des Akt-Proteins auf. **Beta-Aktin** zeigt über den gesamten Versuchszeitraum keinerlei Auffälligkeiten hinsichtlich des Aktivitätsgrades. **Src** zeigt zwischen fünf und 15 Minuten eine weniger ausgeprägte Phosphorylierung als die Kontrolle. **p38 MAP Kinase** zeigt keine Abweichungen von der Kontrollgruppe. Das Protein **NF-κB p65** erfährt nach fünf Minuten eine Reduktion des Phosphorylierungsgrades. Nach 120 Minuten der

Behandlung mit Roburin D ist ein Anstieg an phosphorylierten Protein feststellbar.

In den Gruppen der nicht mit rm-RANKL behandelten RAW-Zellen präsentiert sich die Situation folgendermaßen. Die **MAP-Kinasen p44 und p42** liegen in dem Zeitraum zwischen 60 Minuten und 120 Minuten wesentlich stärker phosphoryliert vor als die Kontrollgruppe. Die Phosphorylierung des **Akt**-Proteins liegt nach einer sowie 120 Minuten unter dem Niveau der Kontrolle. Auch bei den nativen RAW-Zellen zeigt **beta-Aktin** keine Abweichungen hinsichtlich des Phosphorylierungsausmaßes. Die Phosphorylierung von **Src** entspricht weitgehend der Kontrollgruppe. Nur nach 120 Minuten ist eine verminderte Phosphorylierung feststellbar. **p38 MAP Kinase** entspricht über weite Teile der Teststrecke dem Niveau der Kontrolle. Nur nach 120 Minuten ist eine stärkere Phosphorylierung erkennbar. Der Transkriptionsfaktor **NF-κB p65** liegt ab 60 Minuten Einwirkzeit weniger stark phosphoryliert vor als die Kontrollgruppe.

4. Zusammenfassung

Polyphenole stellen weit verbreitete Inhaltsstoffe verschiedener Pflanzen dar und zeichnen sich durch ihre ausgeprägten antioxidativen Eigenschaften aus. Ellagitannine gehören zur Gruppe der Hydrolysierbaren Tannine, die ihrerseits eine Untergruppe der pflanzlichen Polyphenole darstellen. Innerhalb der Ellagitannine gibt es eine Gruppe von Vertretern, die neben der ubiquitär vorhandenen 3,4,5,3',4',5'-Hexahydroxydiphenoyl-Einheit (HHDP) eine weitere charakteristische Gruppe, den 2,3,5-Nonahydroxyterphenoyl-Rest (NHTP), aufweisen. Diese Verbindungen kommen vor allem im Holz verschiedener Eichen- und Kastanienarten vor und können während des Reifungsprozesses alkoholischer Getränke in Holzfässern in das Genussmittel, und somit in die Nahrungskette, gelangen.

Im Verlauf unserer *in vitro* Forschungen untersuchten wir den Einfluss zweier Vertreter der Ellagitannine mit NHTP-Gruppen, die Ellagitannin-Dimere Roburin A und Roburin D, auf die Resorptionstätigkeit mehrkerniger, reifer Osteoklasten. Beide Substanzen zeigten in einem Pit-Assay eine vergleichbare Hemmung der Resorption durch Osteoklasten aus murinen Knochenmarkszellen an Knochenplättchen von Rindern. Die maximale Aktivität entwickelten die untersuchten Roburine bei einer Konzentration von 50 μM des Ellagitannins, wobei der durchschnittliche Anteil der Resorptionsareale an der Gesamtknochenfläche durchwegs um 1 % lag. Weiters wurde die Stabilität und Wirksamkeit der beiden Roburine bei einem leicht sauren pH-Wert von 6,7 nachgewiesen.

Im weiteren Verlauf unserer Untersuchungen versuchten wir an Hand der Western-Blot-Methode die Veränderungen der intrazellulären Signaltransduktionswege ausfindig zu machen, die sich für das verringerte Resorptionsausmaß verantwortlich zeigen. Hinsichtlich des Einflusses auf die intraosteoklastäre Signaltransduktion lieferten beide Substanzen sehr unterschiedliche Ergebnisse, so dass eine generelle Aussage schwer fällt. Nur die Veränderungen in der Phosphorylierung von Akt- und Src-Protein zeigten gewisse Parallelen, wobei vor allem die Beeinflussung von Src wegen seiner

Auswirkungen auf das Zytoskelett und somit auf Osteoklasten-Migration und Knochenresorption von Bedeutung scheint.

5.Diskussion

Ellagitannine gehören zur Gruppe der hydrolysierbaren Tannine und erfahren als solche durch Säuren oder Basen eine hydrolytische Freisetzung von Hexahydroxydiphensäure, die spontan in Ellagsäure umgesetzt wird. (Espin et al., 2007; Fridrich et al., 2008; Niemetz und Gross, 2005) Daniel et al. spezifizierten, dass Ellagitannine bei neutralem oder alkalischem pH-Wert nicht stabil sind und Ellagsäure freisetzen. (Ross et al., 2007). Diese Erkenntnis deckt sich mit den Berichten von Larossa et al., dass Ellagsäure *in vitro* bei physiologischem pH-Wert des Dünndarms nicht-enzymatisch freigesetzt wird. (Espin et al., 2007) Um die, als festes Pulver vorliegenden Roburine in der Zellkultur verwenden zu können, wird eine genau bemessene Menge des Feststoffes in α -MEM-Kulturmedium gelöst. Der pH-Wert dieses Nährmediums liegt im neutralen Bereich bei 7,1. Dem zu folge ist eine lytische Freisetzung von Ellagsäure während der Probenvorbereitung nicht auszuschließen. Insofern erscheint es noch unklar, ob die Hemmung der osteoklastären Knochenresorption alleine den verwendeten Ellagitanninen zuzuschreiben ist. Ein Vergleich der vorliegenden Ergebnisse der Roburine mit der Wirkung reiner Ellagsäure sollte noch durchgeführt werden.

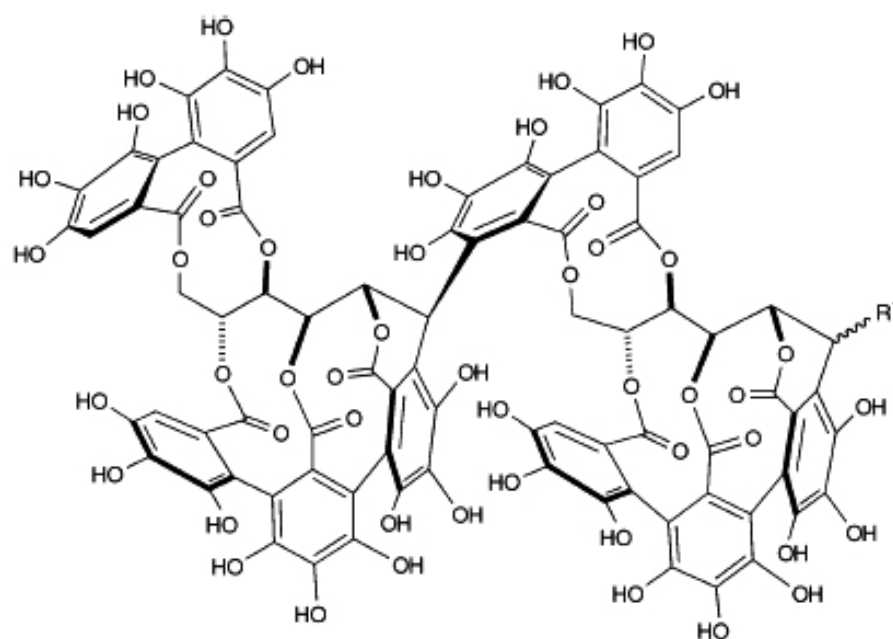


Abbildung 19: Grundgerüst der Ellagitannine Roburin A und Roburin D. Beide Verbindungen unterscheiden sich nur hinsichtlich der Orientierung einer Hydroxylgruppe (R_1). Ein α -ständiger Rest kennzeichnet Roburin D. Steht die Hydroxylgruppe in β spricht man von Roburin A. (Quideau et al., 2004)

Roburine A und Roburin D sind Dimere der Ellagitannine Vescalagin bzw. Castalagin. Ebenso wie die monomeren Verbindungen unterscheiden sich die Dimere nur hinsichtlich der Orientierung einer Hydroxylgruppe an einer der NHTP-Einheiten. Roburin D ist also das Epimer des Roburin A, genauso wie Vescalagin als Epimer des Castalagin zu verstehen ist. Wie Quideau et al. bewiesen haben, hat die Orientierung der Hydroxylgruppe einen wesentlichen Einfluss auf die Aktivität der monomeren Ellagitannine. So zeigt Vescalagin eine zehn Mal höhere Aktivität gegenüber Acyclovir-empfindlichen Herpes Simplex Virenstämmen als Castalagin. Diesen Umstand führten die Autoren darauf zurück, dass die β -OH-Gruppe des Vescalagin auf Grund der Orientierung in den freien Raum die Erkennung viraler Biomoleküle erleichtert. Im Gegensatz dazu ist die α -OH-Gruppe des Castalagin zur Ausbildung stabilisierender intramolekularer Wasserstoffbrücken befähigt und steht somit nicht für die Erkennung viraler Proteine zur Verfügung. (Quideau et al., 2004) Da sich die Dimere Roburin A und D ebenfalls alleine hinsichtlich der Orientierung einer Hydroxylgruppe unterscheiden, wäre eine unterschiedliche Aktivität der Substanzen in manchen Aspekten durchaus vorstellbar. Noch nicht geklärt war, ob die molekularen

Targets am Osteoklasten eine der Ausrichtungen der Hydroxylgruppe bevorzugen, oder ob das System gegenüber den stereochemischen Auswirkungen unempfindlich ist. Die während der Resorptionsuntersuchungen gewonnenen Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Stellung der OH-Gruppe an der NHTP-Einheit für die Hemmung des Knochenabbaus nicht von Bedeutung ist. Beide Dimere erzielen bei der maximalen Konzentration von 50 μM Ellagitannin einen vergleichbaren Effekt auf die Knochenresorption. Auch durch Ansäuern der Co-Kultur ändert sich an diesem Bild nichts. Dem zu folge scheinen die stereochemischen Aspekte der Ellagitannin-Dimere Roburin A und Roburin D für die Wirkung auf den Osteoklasten nicht von Bedeutung.

Mittels RANKL aus RAW 264.7 Zellen generierte Osteoklasten wurden über zwei Stunden hinweg mit 10 μM des jeweiligen Ellagitannins behandelt, um den Einfluss der Roburine auf bestimmte Signalproteine der Proliferation und Apoptose zu untersuchen.

Die Auswirkung auf den nukleären Transkriptionsfaktor NF- κB

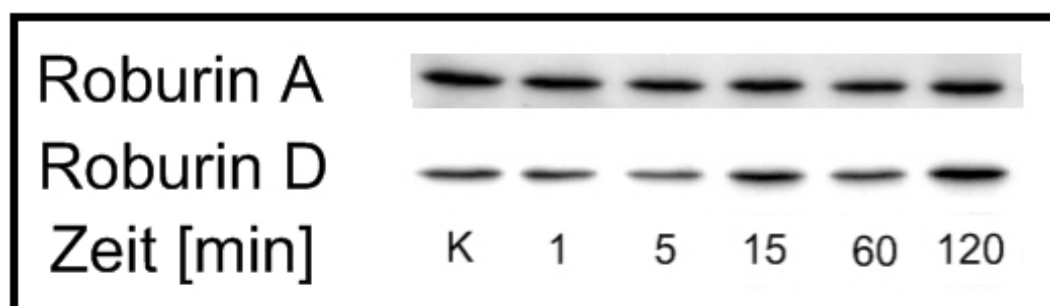


Abbildung 20: Das Signal zeigt den Anteil an phosphoryliertem Transkriptionsfaktor NF- κB nach Behandlung mit 10 μM Roburin A bzw. D. (K) Kontrolle (1) 1 Minute (5) 5 Minuten (15) 15 Minuten (60) 60 Minuten (120) 120 Minuten Behandlungsdauer

Der nukleäre Transkriptionsfaktor NF- κB ist ein wesentlicher Faktor während der RANKL-induzierten Osteoklastogenese. Über die Ausbildung funktionsfähiger Aktinring-Strukturen, RANKL-induzierte Migration der knochenresorbierenden Zellen sowie die Expression von Genen, die für die Osteoklastenfunktionalität unerlässlich sind, ist NF- κB ein bedeutender Promotor des osteoklastären

Knochenabbau. (Soysa et al., 2009) Die Gruppe um Wattel beschrieb, dass das Polyphenol Quercetin den RANKL-induzierten Transkriptionsfaktor NF- κ B sowie AP-1 in RAW 264.7 Zellen hemmt. Park et al. hingegen fanden während ihrer Untersuchungen der Wirkung des Ellagitannins Furosin auf Differenzierung und Funktion von Osteoklasten keinen Hinweis auf einen hemmenden Effekt auf die RANKL-induzierte Aktivierung von NF- κ B. (Park et al., 2004) Die, im Rahmen dieser Diplomarbeit mit den Ellagitanninen Roburin A und D durchgeführten Versuche an RANKL-behandelten RAW 264.7 Zellen zeigten nach fünfminütiger Behandlung mit Roburin D eine Verringerung der Aktivität von NF- κ B. Nach 120 Minuten Behandlungsdauer ist eine verstärkte Aktivierung des Transkriptionsfaktors zu bemerken. Roburin A hingegen zeigte in unseren Versuchen keinerlei Auffälligkeiten hinsichtlich der RANKL-induzierten Aktivierung von NF- κ B. Parks Aussage, dass eine Inhibierung der NF- κ B-Aktivität durch Polyphenole möglich ist, das Ausmaß selbiger aber von der Art der eingesetzten Verbindung abhängt (Park et al., 2004), erscheint im Licht der variierenden Resultate der getesteten Ellagitannine durchaus plausibel.

Die Effekte auf die p38-MAP-Kinase

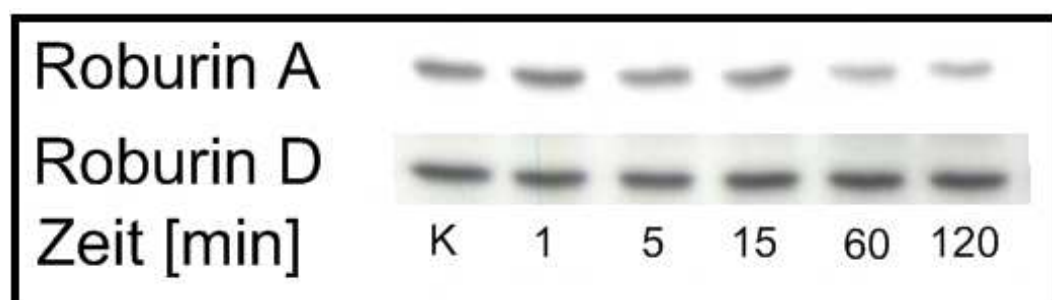


Abbildung 21: Der Anteil an phosphorylierter p38 MAP-Kinase nach Behandlung mit 10 μ M Roburin A bzw. D. (K) Kontrolle (1) 1 Minute (5) 5 Minuten (15) 15 Minuten (60) 60 Minuten (120) 120 Minuten Einwirkzeit

Ebenfalls während der Untersuchung der Wirkung von Furosin auf Osteoklasten stellten Park et al. eine verminderte Differenzierung von Vorläuferzellen zu mehrkernigen, funktionsfähigen Osteoklasten fest. Diesen Umstand leiteten sie von der Hemmung der Aktivität der p38 MAP-Kinase ab (Park et al., 2004). Diese

MAP-Kinase wird durch RANKL induziert und ist für die Differenzierung zu resorptionsfähigen Osteoklasten unerlässlich. Aktivierung der p38 MAPK führt zur Aktivierung der Faktoren mi/Mitf, welche die Expression von TRAP und Kathepsin K steuern. (Yi et al., 2006) Weiters spielt die p38 MAPK über die Kontrolle proinflammatorischer Zytokine eine bedeutende Rolle während der Zytokin-induzierten Osteoklastogenese. (Wei und Siegal, 2007) Meine Untersuchungen zeigten eine deutliche Hemmung der Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase durch Roburin A nach 60 Minuten und 120 Minuten. Roburin D hingegen scheint keinerlei Einfluss auf die Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase zu haben. Da die p38 MAP Kinase über die Steuerung der Expression von TRAP und Kathepsin K, zweier wesentlicher Enzyme reifer Osteoklasten, an der Resorption organischer Knochenmatrix beteiligt ist, erscheint die, während des Pit-Assay festgestellte, Hemmung der Resorption im Falle von Roburin A zumindest teilweise auf eine Hemmung des p38 MAPK-Signalweges zurückzuführen zu sein.

Die Beeinflussung der Aktivität der p44/42-MAP-Kinase

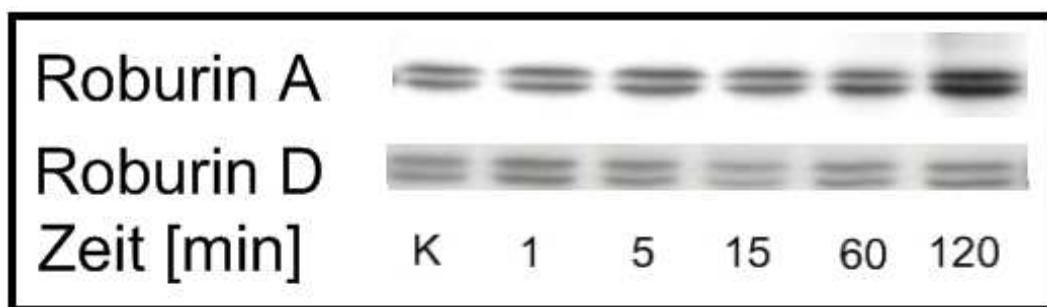


Abbildung 22: Der Anteil an phosphorylierter p44/42-MAP-Kinase nach Behandlung mit 10 μ M Roburin A bzw. D. (K) Kontrolle (1) 1 Minute (5) 5 Minuten (15) 15 Minuten (60) 60 Minuten (120) 120 Minuten Einwirkzeit

Neben der schon genannten p38 MAP-Kinase sind auch noch andere Kinasen wesentlich an der Ausbildung reifer Osteoklasten beteiligt. (Yi et al., 2006) Zu diesen Kinasen zählt, neben JNK, auch die p44/42 MAP-Kinase, deren Aktivität ebenfalls in Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. Nach zweistündiger Behandlung mit Roburin A ist eine starke Phosphorylierung der p44/42 MAP-

Kinase feststellbar. Roburin D hingegen scheint keinerlei Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad dieser MAP-Kinase zu haben. Da hinsichtlich der Funktion der p44/42 MAP-Kinase im Osteoklasten unterschiedliche Ansichten existieren, ist eine Aussage hinsichtlich der Bedeutung dieser Ergebnisse nicht möglich. Als gesichert gilt, dass diese Kinase über RANKL aktiviert und durch die "upstream" gelegene Kinase MEK 1/2 gesteuert wird. Eine Hemmung der MEK 1/2 durch UO126 und PD98059 führte in verschiedenen Studien zu unterschiedlichen Resultaten. In einer Versuchreihe kam es in Folge des Einsatzes der Hemmstoffe zu einer Inhibierung der Differenzierung zu funktionellen Osteoklasten, was darauf schließen lässt, dass die p44/42 MAPK wesentlich an der Osteoklastogenese beteiligt ist. Eine andere Studie lieferte diametral entgegengesetzte Ergebnisse, da es hier zu einer verstärkten Bildung von Osteoklasten unter Einsatz von UO126 und PD98059 kam. (Yi et al., 2006) Dies würde bedeuten, dass die p44/42 MAP-Kinase einen negativen Regulator der Osteoklastogenese darstellt. Diese widersprüchlichen Resultate könnten darauf zurückzuführen sein, dass Intensität und Dauer der MAP-Kinase Aktivierung wesentlich für die endgültige Rolle während der Osteoklastogenese sind oder dass, wie von Hotokezaka et al. vorgeschlagen, das Verhältnis zwischen negativ regulatorischer p44/42 MAP-Kinase und positiv regulatorischer p38 MAPK ausschlaggebend ist. (Yi et al., 2006) Allerdings ist zu bedenken, dass der Zusatz der Roburine teilweise zu bereits ausdifferenzierten Osteoklasten erfolgte, weshalb eine Beeinflussung der Osteoklastendifferenzierung als Ursache der Resorptionshemmung wohl ausscheidet.

Beim Vergleich der beiden Roburine untereinander lässt sich feststellen, dass nur in den wenigsten Fällen eine vergleichbare Änderung des Phosphorylierungsmaßes der betrachteten Proteine auftritt. In der überwiegenden Zahl der Experimente verhalten sich Roburin A und Roburin D hinsichtlich der Änderung des Aktivierungsgrades von Signalproteinen der Osteoklasten sehr unterschiedlich, so dass mit der geringen Zahl an Experimenten noch kein generell gültiges Muster der Beeinflussung der Proteinphosphorylierung durch die Ellagitannin-Dimere erkennbar ist.

Die Auswirkungen auf das Akt-Protein

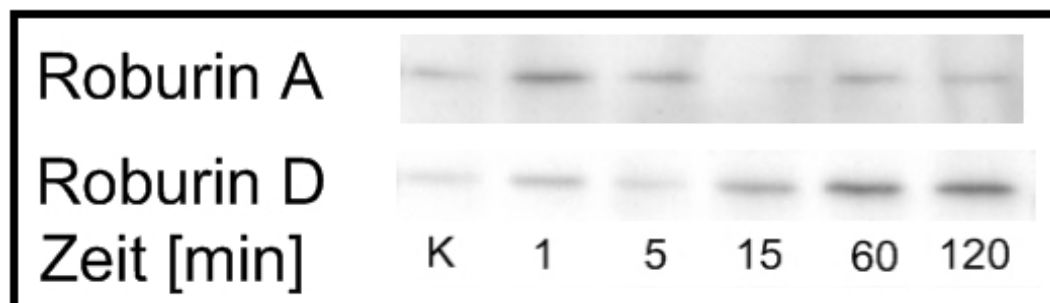


Abbildung 23: Der Anteil an phosphoryliertem Akt nach Behandlung mit 10 μ M Roburin A bzw. D. (K) Kontrolle (1) 1 Minute (5) 5 Minuten (15) 15 Minuten (60) 60 Minuten (120) 120 Minuten Einwirkzeit

Einzig eine verstärkte Phosphorylierung des Akt-Proteins nach einer Minute sowie eine Verringerung des phosphorylierten Anteils des Src-Proteins nach fünf Minuten sind beiden Roburinen gemein. Wie Untersuchungen mit den Proteasom-Hemmstoffen MG132 und ALLN an Osteoklasten zeigten, hat der PI-3K/Akt-Signaltransduktionsweg wesentlichen Einfluss auf das Überleben der Osteoklasten. Durch Aktivierung dieser Signalkaskade, etwa durch proinflammatorisch wirksame Zytokine wie TNF- α und Interleukin-1, kommt es einerseits durch Phosphorylierung der proapoptischen Proteine Bad und Bax zur Inaktivierung dieser Proteine. Andererseits stimuliert Akt die Expression antiapoptischer Proteine durch Aktivierung der NF- κ B-Signalkaskade. In Summe führen diese Vorgänge zur Steigerung der Lebensdauer der Osteoklasten. (Kwak et al., 2008) Roburin A zeigt nach anfänglicher Aktivierung von Akt eine ausgeprägte Verringerung der Phosphorylierung nach 15 Minuten Behandlungsdauer. Nach 60 und 120 Minuten ist allerdings keinerlei Unterschied zur Kontrollgruppe feststellbar. Roburin D zeigt neben wechselhaften Auf und Ab des Aktivierungsgrades in den ersten 15 Minuten eine starke Vermehrung des phosphorylierten Akt-Anteils nach 60 und 120 Minuten. Dieser Umstand ließe auf eine Verlängerung der osteoklastären Lebensdauer durch Roburin D schließen und steht im Gegensatz zur im Pit-Assay vorgefundenen verminderten Resorption.

Die Einflüsse auf die Phosphorylierung des Src-Proteins

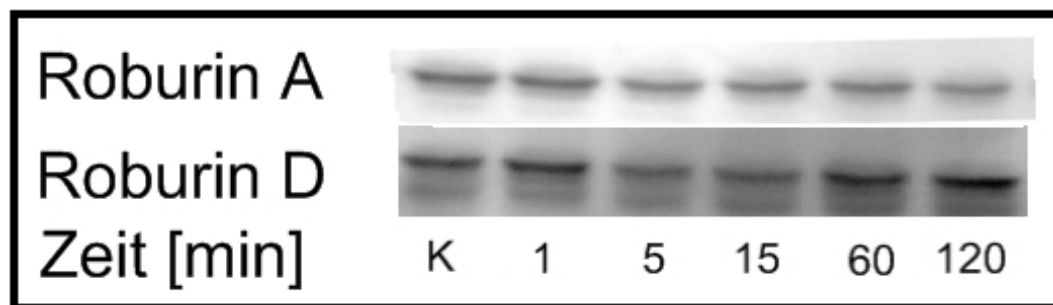


Abbildung 24: Der Anteil an phosphoryliertem Src nach Behandlung mit 10 μ M Roburin A bzw. D. (K) Kontrolle (1) 1 Minute (5) 5 Minuten (15) 15 Minuten (60) 60 Minuten (120) 120 Minuten Einwirkzeit

Eine mögliche Ursache für die verringerte Osteoklastentätigkeit unter Ellagitannin-Behandlung stellt die verringerte Aktivierung des Src-Kinase-Proteins dar. Sowohl Roburin A als auch D führen nach fünfminütiger Behandlung zu einer Verringerung des Anteils an phosphoryliertem, aktivem Protein. Roburin D zeigt diesen Effekt ebenso nach 15 Minuten Behandlungsdauer. Unter Roburin A-Zusatz ist erst nach zwei Stunden eine weitere Reduktion an aktivem Src feststellbar. Besonders bemerkenswert ist hierbei, dass sich die, nicht mit RANKL behandelten RAW-Zellen hinsichtlich des Phosphorylierungsmusters des Src-Proteins drastisch von den, mittels RANKL zu Osteoklasten differenzierten, RAW-Zellen unterscheiden. Die nicht mit RANKL behandelten RAW-Zellen zeigen unter Behandlung mit Roburin A nach 15 minütiger Behandlung eine ausgeprägte Src-Aktivierung. Diese wurde ebenfalls nach einer und zwei Stunden festgestellt. Die Behandlung der unstimulierten RAW-Zellen mit Roburin D zeigt ein gänzlich anderes Bild. Hierbei wurde nach fünf-, 60- und 120-minütiger Behandlung mit der Ellagitanninlösung eine Verringerung der Src-Aktivität festgestellt. (Daten nicht angegeben)

Src ist wesentlich an Organisation und Dynamik von Aktin in den Podosomen beteiligt. (Yogo et al., 2007) Stimulation des Src-Kinase-Signalweges fördert die Bildung des Aktin-Kernes sowie die Aktin-Translokation in den Kern. Es unterstützt die Bildung der Aktin-Wolke und des Podosomengürtels und

ermöglicht den Abbau einzelner Podosomen. Src ist also wesentlich an Podosomen-Bildung und Abbau beteiligt. Wie experimentell nachgewiesen werden konnte, führt die Entfernung des Src-Gens bzw. die Inaktivierung der Src-Aktivität zu einer verringerten Resorptionstätigkeit und Motilität bei Osteoklasten. Podosomen werden zwar ausgebildet, bleiben aber auf einer frühen Entwicklungsstufe stehen. (Destaing et al., 2008) Src-Aktivität ist also über die Regulation der Zytoskelettstruktur an Osteoklasten-Migration und osteoklastärer Knochenresorption beteiligt. (Yogo et al., 2007) Dem entsprechend präsentiert sich die, während meiner Versuche mit den Ellagitannin-Dimeren festgestellte Hemmung der Phosphorylierung von Src als guter Ansatz zur Erklärung der verminderten Knochenresorption unter Behandlung mit Roburin A und Roburin D.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ellagitannine Roburin A und Roburin D *in vitro* eine ausgeprägte Hemmwirkung auf die osteoklastäre Knochenresorption in einem Co-Kultursystem aufweisen. Die maximal wirksame Konzentration beider Verbindungen liegt bei 50 μ M Ellagitannin. Die Beeinflussung der Aktivität von Signaltransduktionsproteinen erfolgt zwischen beiden Substanzen sehr unterschiedlich. Nur Akt- und Src-Phosphorylierung zeigen gewisse Parallelen. Vor allem die verminderte Src-Aktivierung scheint ein guter Erklärungsansatz für die gefundene Resorptionshemmung, da diese Signalkaskade wesentlich für die Organisation des Zytoskeletts und somit für Motilität und Osteoklastenaktivität ist.

6.Literaturverzeichnis

- Anderson KJ, Teuber SS, Gobeille A, Cremin P, Waterhouse AL, Steinberg FM
2001 Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL
oxidation. *J Nutr* **131**(11):2837-42.
- Arbor A. Available at:
<http://www.umich.edu/news/Releases/2005/Feb05/bone.html>. Accessed
July 15,2009
- Aubin JE, Lian JB, Stein GS 2006 Chapter 4. Bone Formation: Maturation and
Functional Activities of Osteoblast Lineage Cells Primer on the Metabolic
Bone Diseases And Disorders of Mineral Metabolism, 6th ed. American
Society for Bone Mineral Research, pp 20-29.
- Azorin-Ortuno M, Urban C, Ceron JJ, Tecles F, Gil-Izquierdo A, Pallares FJ,
Tomas-Barberan FA, Espin JC 2008 Safety evaluation of an oak-flavored
milk powder containing ellagitannins upon oral administration in the rat. *J
Agric Food Chem* **56**(8):2857-65.
- Cenci S, Toraldo G, Weitzmann MN, Roggia C, Gao Y, Qian WP, Sierra O,
Pacifci R 2003 Estrogen deficiency induces bone loss by increasing T cell
proliferation and lifespan through IFN-gamma-induced class II
transactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(18):10405-10.
- Cerda B, Tomas-Barberan FA, Espin JC 2005 Metabolism of antioxidant and
chemopreventive ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts, and
oak-aged wine in humans: identification of biomarkers and individual
variability. *J Agric Food Chem* **53**(2):227-35.
- Dempster DW 2006 Chapter 2. Anatomy and Function of the Adult Skeleton
Primer on the Metabolic Bone Diseases And Disorders of Mineral
Metabolism, 6th edition, 6th ed. American Society for Bone and Mineral
Research, pp 7-11.
- Destaing O, Sanjay A, Itzstein C, Horne WC, Toomre D, De Camilli P, Baron R
2008 The tyrosine kinase activity of c-Src regulates actin dynamics and
organization of podosomes in osteoclasts. *Mol Biol Cell* **19**(1):394-404.
- Espin JC, Garcia-Conesa MT, Tomas-Barberan FA 2007 Nutraceuticals: facts and
fiction. *Phytochemistry* **68**(22-24):2986-3008.
- Espin JC, Gonzalez-Barrio R, Cerda B, Lopez-Bote C, Rey AI, Tomas-Barberan
FA 2007 Iberian pig as a model to clarify obscure points in the
bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans. *J Agric Food
Chem* **55**(25):10476-85.

- Flesch M, Schwarz A, Bohm M 1998 Effects of red and white wine on endothelium-dependent vasorelaxation of rat aorta and human coronary arteries. *Am J Physiol* **275**(4 Pt 2):H1183-90.
- Fridrich D, Glabasnia A, Fritz J, Esselen M, Pahlke G, Hofmann T, Marko D 2008 Oak ellagitannins suppress the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in human colon carcinoma cells. *J Agric Food Chem* **56**(9):3010-5.
- Glabasnia A, Hofmann T 2007 Identification and sensory evaluation of dehydro- and deoxy-ellagitannins formed upon toasting of oak wood (*Quercus alba* L.). *J Agric Food Chem* **55**(10):4109-18.
- Heber D 2008 Multitargeted therapy of cancer by ellagitannins. *Cancer Lett* **269**(2):262-8.
- Heber D, Seeram NP, Wyatt H, Henning SM, Zhang Y, Ogden LG, Dreher M, Hill JO 2007 Safety and antioxidant activity of a pomegranate ellagitannin-enriched polyphenol dietary supplement in overweight individuals with increased waist size. *J Agric Food Chem* **55**(24):10050-4.
- Key LL, Jr., Rodriguiz RM, Willi SM, Wright NM, Hatcher HC, Eyre DR, Cure JK, Griffin PP, Ries WL 1995 Long-term treatment of osteopetrosis with recombinant human interferon gamma. *N Engl J Med* **332**(24):1594-9.
- Kwak HB, Lee MS, Kim HS, Cho HJ, Kim JW, Lee ZH, Oh J 2008 Proteasome inhibitors induce osteoclast survival by activating the Akt pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **377**(1):1-6.
- Liu F, Kohlmeier S, Wang CY 2008 Wnt signaling and skeletal development. *Cell Signal* **20**(6):999-1009.
- Niemetz R, Gross GG 2005 Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry* **66**(17):2001-11.
- Park EK, Kim MS, Lee SH, Kim KH, Park JY, Kim TH, Lee IS, Woo JT, Jung JC, Shin HI, Choi JY, Kim SY 2004 Furosin, an ellagitannin, suppresses RANKL-induced osteoclast differentiation and function through inhibition of MAP kinase activation and actin ring formation. *Biochem Biophys Res Commun* **325**(4):1472-80.
- Quideau S, Jourdes M, Lefeuvre D, Montaudon D, Saucier C, Glories Y, Pardon P, Pourquier P 2005 The chemistry of wine polyphenolic C-glycosidic ellagitannins targeting human topoisomerase II. *Chemistry* **11**(22):6503-13.
- Quideau S, Varadinova T, Karagiozova D, Jourdes M, Pardon P, Baudry C, Genova P, Diakov T, Petrova R 2004 Main structural and stereochemical

aspects of the antiherpetic activity of nonahydroxyterphenoyl-containing C-glycosidic ellagitannins. *Chem Biodivers* **1**(2):247-58.

- Robey PM, Boskey AL 2006 Chapter 3. Extracellular Matrix and Biomineralization of Bone Primer on the Metabolic Bone Diseases And Disorders of Mineral Metabolism, 6th ed. American Society for Bone Mineral Research, pp 12-19.
- Ross FP 2006 Chapter 5. Osteoclast Biology and Bone Resorption Primer on the Metabolic Bone Diseases And Disorders of Mineral Metabolism, 6th ed. American Society for Bone Mineral Research, pp 30-35.
- Ross HA, McDougall GJ, Stewart D 2007 Antiproliferative activity is predominantly associated with ellagitannins in raspberry extracts. *Phytochemistry* **68**(2):218-28.
- Seeram NP, Aronson WJ, Zhang Y, Henning SM, Moro A, Lee RP, Sartippour M, Harris DM, Rettig M, Suchard MA, Pantuck AJ, Belldegrund A, Heber D 2007 Pomegranate ellagitannin-derived metabolites inhibit prostate cancer growth and localize to the mouse prostate gland. *J Agric Food Chem* **55**(19):7732-7.
- Shukla M, Gupta K, Rasheed Z, Khan KA, Haqqi TM 2008 Consumption of hydrolyzable tannins-rich pomegranate extract suppresses inflammation and joint damage in rheumatoid arthritis. *Nutrition* **24**(7-8):733-43.
- Soysa NS, Alles N, Shimokawa H, Jimi E, Aoki K, Ohya K 2009 Inhibition of the classical NF-kappaB pathway prevents osteoclast bone-resorbing activity. *J Bone Miner Metab* **27**(2):131-9.
- Trzeciakiewicz A, Habauzit V, Horcajada MN 2009 When nutrition interacts with osteoblast function: molecular mechanisms of polyphenols. *Nutr Res Rev* **22**(1):68-81.
- Wei S, Siegal GP 2007 p38 MAPK as a potential therapeutic target for inflammatory osteolysis. *Adv Anat Pathol* **14**(1):42-5.
- Weinstein RS, Chen JR, Powers CC, Stewart SA, Landes RD, Bellido T, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC 2002 Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids. *J Clin Invest* **109**(8):1041-8.
- Yi T, Kim HJ, Cho JY, Woo KM, Ryoo HM, Kim GS, Baek JH 2006 Tetraspanin CD9 regulates osteoclastogenesis via regulation of p44/42 MAPK activity. *Biochem Biophys Res Commun* **347**(1):178-84.
- Yogo K, Ishida-Kitagawa N, Takeya T 2007 Negative autoregulation of RANKL and c-Src signaling in osteoclasts. *J Bone Miner Metab* **25**(4):205-10.

Yun JH, Kim CS, Cho KS, Chai JK, Kim CK, Choi SH 2007 (-)-Epigallocatechin gallate induces apoptosis, via caspase activation, in osteoclasts differentiated from RAW 264.7 cells. *J Periodontal Res* **42**(3):212-8.

Zaidi M 2007 Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med* **13**(7):791-801.

7.Index der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen:		
Abb. 1	Die acht wesentlichen, NHTP-Gruppen-umfassenden Ellagitannine	Seite 11
Abb. 2	Metabolismus von Ellagitanninen	Seite 16
Abb. 3	Der Aufbau eines Röhrenknochens	Seite 31
Abb. 4	Die Phasen des Bone Remodeling	Seite 35
Abb. 5	Die Entwicklung pluripotenter Stammzellen zu Zellen der mesenchymalen Stammzelllinie	Seite 39
Abb. 6	Der <i>Canonical Wnt Signaling Pathway</i>	Seite 40
Abb. 7	Die verschiedenen Stadien der Osteoblastenentwicklung	Seite 41
Abb. 8	Wesentliche intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden der Osteoklasten	Seite 47
Abb. 9	Ein mehrkerniger Osteoklast während der Resorptionstätigkeit	Seite 48
Abb. 10	Der kanonische Signaltransduktionsweg ohne und mit Stimulus	Seite 51
Abb. 11	Die Anordnung der Gruppen auf der Wellplatte	Seite 63
Abb. 12	Schema der Prozedur der Auswertung eines Knochenplättchens	Seite 65
Abb. 13	Einfluss von Roburin A unterschiedlicher Konzentrationen auf die Resorptionstätigkeit von Osteoklasten	Seite 76
Abb. 14	Hemmwirkung von Roburin A bei saurem pH-Wert	Seite 78
Abb. 15	Westernblot-Analyse der Roburin A-Wirkung	Seite 80
Abb. 16	Einfluss von Roburin D unterschiedlicher Konzentrationen auf die Resorptionstätigkeit von Osteoklasten	Seite 83
Abb. 17	Hemmwirkung von Roburin D bei saurem pH-Wert	Seite 85
Abb. 18	Westernblot-Analyse der Roburin D-Wirkung	Seite 87
Abb. 19	Grundgerüst der Ellagitannine Roburin A und Roburin D	Seite 93
Abb. 20	NF- κ B-Signal nach Behandlung mit Roburin A/D	Seite 94
Abb. 21	p38-MAPK-Signal nach Behandlung mit Roburin A/D	Seite 95
Abb. 22	p44/42-MAPK-Signal nach Behandlung mit Roburin A/D	Seite 96
Abb. 23	Akt-Signal nach Behandlung mit Roburin A/D	Seite 98
Abb. 24	Src-Signal nach Behandlung mit Roburin A/D	Seite 99

Tabellen:		
Tab. 1	Vertreter der Nicht-kollagenen Proteine in der organischen Knochenmatrix	Seite 34
Tab. 2	Faktoren mit Einfluss auf osteoklastäre Funktionen	Seite 47
Tab. 3	Das Layout des Versuchs auf vier 6-Wellplatten	Seite 67
Tab. 4	Die verwendeten primären Antikörper	Seite 71
Tab. 5	Die verwendeten sekundären Antikörper	Seite 72
Tab. 6	Reihenfolge des Aufbringens der primären Antikörper	Seite 73
Tab. 7	Resorptionsquoten der Knochenplättchen (Roburin A, Standard-pH)	Seite 77
Tab. 8	Resorptionsquoten der Knochenplättchen (Roburin A, saurer pH)	Seite 79
Tab. 9	Zusammenfassung der Ergebnisse des Signaltransduktionsexperimente mit Roburin A	Seite 81
Tab. 10	Resorptionsquoten der Knochenplättchen (Roburin D, Standard-pH)	Seite 84
Tab. 11	Resorptionsquoten der Knochenplättchen (Roburin D, saurer pH)	Seite 86
Tab. 12	Zusammenfassung der Ergebnisse des Signaltransduktionsexperimente mit Roburin D	Seite 88

8. Curriculum Vitae

Name:	Michael Schnattinger
Geburtsdatum:	22.03.1983
Geburtsort:	Wien
Vater:	Kurt Schnattinger, Mag.pharm.
Mutter:	Christa Schnattinger
Geschwister:	Birgit Schnattinger, Mag.pharm. Katrín Schnattinger, Mag.pharm.
Staatsangehörigkeit:	Österreich
Religionsbekenntnis:	Römisch-Katholisch
Schulische Laufbahn :	
1989-1993	Besuch der Volksschule Neulengbach, 3040 Neulengbach Josef-Weinheberstraße 126
1993-2001	Besuch des Bundesgymnasiums und Bundesrealgymnasiums St.Pölten, 3100 St.Pölten Josefstraße 84
Juni 2001	Schulabschluss mit Matura
Oktober 2002:	Beginn des Pharmaziestudiums an der Universität Wien