



universität
wien

DIPLOMARBEIT

**Hemmung der osteoklastären Funktion
durch neue Src-Kinaseinhibitoren
vom Pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-typ**

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasser:	Gerhard Angerer
Matrikel-Nummer:	9206797
Studienrichtung	
(lt. Studienblatt):	Pharmazie
Betreuerin / Betreuer:	Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Oskar Hoffmann

Danksagung

Ich danke Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Oskar Hoffmann für das interessante Thema und die gute fachliche Betreuung.

Ich danke Frau Barbara Berger für die ausgezeichnete fachkundige Betreuung bei den Versuchen.

Ich danke Herrn Peter Höflich für sterile Pipetten, guten Kaffee und gepflegten Humor.

Danksagung.....	2
Inhaltsverzeichnis	3
Liste der verwendeten Abkürzungen	5
1 Einleitung.....	6
1.1 Physiologie des Knochens.....	6
1.1.1 Die Osteoblasten.....	6
1.1.2 Die Osteozyten	7
1.1.3 Die Osteoklasten.....	7
1.1.3.1 Src-Kinase	8
1.1.4 Das Bone-Remodeling	13
1.2 Ziel der Diplomarbeit.....	14
2 Materialien und Methodik.....	16
2.1 Verwendete Materialien und Geräte	16
2.2 Verwendete Substanzen, Puffer und Farbstofflösungen.....	17
2.3 Methodik	18
2.3.1 Bestimmung der Resorptionsaktivität von Osteoklasten („Pit-Assay“) 19	
2.3.1.1 Durchführung der Osteoblasten-Knochenmark-Co-Kultur	19
2.3.1.2 Durchführung der Toluidinblaufärbung.....	23
2.3.2 Auswertungen	24
2.3.2.1 Auswertung mit Nikon/Photoshop/NIH-Image.....	24
2.3.2.2 Auswertung mit Olympus/Cell^F	24
2.3.3 Validierung der Auswertemethoden	25
2.3.3.1 Validierung der ausgewerteten Flächen.....	25
2.3.3.2 Validierung der Auswertemethoden	29
2.3.3.3 Validierung der Auswertezeit	32
2.3.4 Bestimmung der Osteoklastengenese mittels TRAP-Färbung	33
2.3.4.1 Auswertung.....	34
2.3.5 Bestimmung der Zytoskelettbildung mittels Rhodamin-Dapi-Färbung.35	
2.3.5.1 Auswertung	37
2.3.6 Statistische Auswertung mit Excel, StatView II und Prism 4	37
3 Ergebnisse.....	39

3.1	Austestung der Wirkung von SI83 auf die Resorptionsaktivität von Osteoklasten	39
3.2	Austestung der Wirkung von S7 und SI20 auf die Resorptionsaktivität von Osteoklasten	40
3.3	Austestung der Wirkung der Wirkung von S13 und S31 auf die Resorptionsaktivität von Osteoklasten	47
3.4	Austestung der Wirkung von S13 und S31 auf die Osteoklastengenese	52
3.5	Austestung der Wirkung von S13 und S31 auf die Zytoskelettbildung und Apoptoseverhaltens von Osteoklasten.....	55
4	Zusammenfassung.....	65
5	Diskussion	66
6	Literaturverzeichnis	69
7	Index der Abbildungen und Tabellen.....	71
8	Curriculum vitae	74

Liste der Abkürzungen

1 α , 25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃	1 α ,25-Dihydroxycholecalciferol
α -MEM	Minimal essentielles Medium, α Modifikation
BMP	<i>bone morphogenic proteins</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
FCS	Fetales Kälberserum
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
OPG	Osteoprotegerin
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphate buffered saline solution
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
RANK	<i>receptor activator of NFκB</i>
RANKL	<i>receptor activator of NFκB Ligand</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
TNF α	<i>tumor necrosis factor α</i>
TRAP	Tartrat resistant acid Phosphatase
Wnt	<i>wingless-int</i>

1 Einleitung

1.1 Physiologie des Knochens

Der Knochen stellt eine spezialisierte, sehr dichte Form des Bindegewebes dar und bildet gemeinsam mit dem Knorpel das Skelett. Diese beiden Gewebe haben drei wesentliche Funktionen im Organismus. Einerseits dienen sie dem Organismus als mechanische Stütze und schützen die Organe und das Knochenmark vor Krafteinwirkungen von außen, andererseits dient der Knochen als Calcium- und Phosphatreservoir, von dem aus der Organismus diese bei Bedarf lukrieren kann.

85% des Gewichtes eines Knochens besteht aus Fasern, den Typ-1-Kollagen-Fibrillen, und festigkeitsgebenden Calciumphosphathydroxylapatit-Kristallen.

Die restlichen 15% bestehen aus lebenden Zellen, die für das Bone-Remodeling sorgen. Zu diesen Zellen gehören Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten.

1.1.1 Die Osteoblasten

Histologisch sind drei unterschiedliche Zelltypen erkennbar: Osteoblasten, Osteoclasten und Osteocyten. Osteoblasten entstehen aus mesenchymalen Stammzellen über lokale Osteoprogenitor-Zellen, während Osteoclasten durch Fusion mononuclearer Vorläuferzellen entstehen.

Der einleitende Schritt zur Osteoblastogenese ist die forcierte Expression von Hormonen und Cytokinrezeptoren, wie z.B.: PTH, Prostaglandine, Interleukin (IL)-1 α , Insulin-like growth Faktor-1 (IGF-1) und TGF- β Rezeptoren. Nach den Early-Events, die durch Wingless-ints (Wnts) und Bone morphogenetic Proteins (BMPs) gesteuert werden, stoppen die Osteoblasten die Proliferation, exprimieren Alkalische Phosphatase und beginnen mit der Ausscheidung von Typ 1 Collagen und Nicht-Collagenösen Matrixproteinen. In diesem Stadium, in dem sich der Osteoblast durch eine charakteristische Morphologie auszeichnet, werden Matrixproteine synthetisiert. Die Mineralisation dieser Matrix Proteine beinhaltet die Expressierung von calciumreichen Vesikeln, gefolgt von der enzymatischen Spaltung durch Pyrophosphat, wahrscheinlich durch die

Alkalische Phosphatase, ist aber zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt. (Zaidi 2007)

1.1.2 Die Osteozyten

Vollentwickelte Osteoblasten werden in der exprimierten Matrix eingebettet und differenzieren zu Osteozyten. Solche spezialisierten Knochenzellen produzieren keine Alkalische Phosphatase, stattdessen andere Knochenmatrixproteine, unter anderem Osteopontin. Osteozyten kommunizieren untereinander mittels filopodialen Ausstülpungen über Zell-Zell Kanäle. (Zaidi 2007)

1.1.3 Die Osteoklasten

Osteoklasten sind große, vielzellige Zellen, die, wie schon beschrieben, durch Fusion aus mononuklearen, hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks entstehen. Sie besitzen die einzigartige Fähigkeit Knochen zu resorbieren. Damit tragen sie ihren Beitrag zur diversen physiologischen Prozessen im Körper bei, wie z.B.: Stabilität des Calciumspiegels im Blut. Gemeinsam mit Monozyten und Makrophagen und weiteren Zelltypen zählen sie zum Mononukleären Phagozytensystem. (Roche-Lexikon 1999)

Die Aktivierung der Osteoklasten erfolgt über den RANK ("receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B"-) Ligand (RANKL). Durch die Bindung von RANKL an den Rezeptor RANK wird die Knochenresorption eingeleitet. OPG (Osteoprotegerin) blockiert die Bindung von RANK-Ligand an RANK und verhindern den Knochenabbau. (Preisinger 2007)

Der Mechanismus wird in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

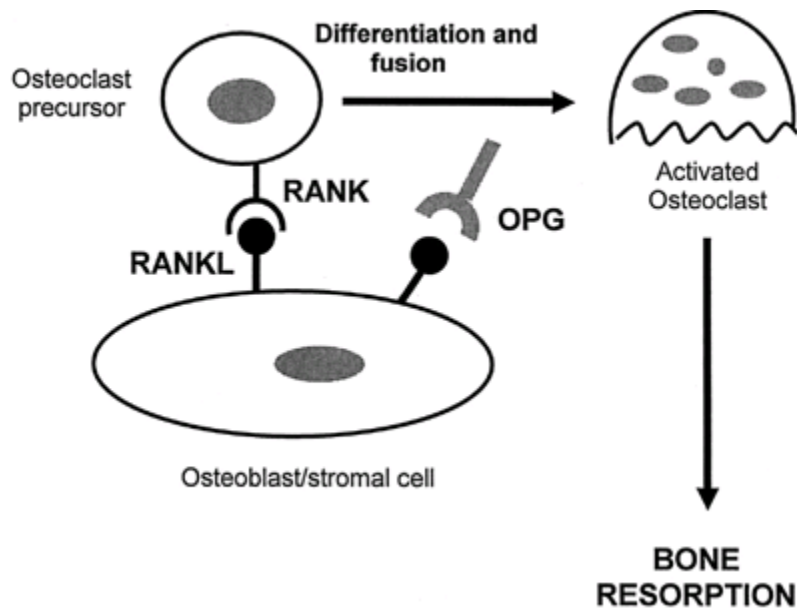


Abbildung 1: Steuerung der Knochenresorption. Erklärung im Text.

Die Aktivität der Osteoklasten wird im gesunden adulten Menschen den Erfordernissen der Knochenmorphogenese und dem Bone-remodeling angepasst. Exzessive Resorption führt zu verminderter Knochendichte, wie sie bei Osteoporose, Morbus Paget, osteolytischen Knochenkrebs u.s.w. zu beobachten ist. (Zaidi 2007)

1.1.3.1 Src-Kinase

Die Src Kinase ist der Prototyp der Familie der Src-Kinasen (SFKs), die größte Familie der nicht rezeptoralen Protein-Tyrosin-Kinasen. Die SFK-Familie besteht aus neun Mitgliedern (Blk, Fgr, Fyn, Hck, Lck, Lyn, Src, Yes und Yrk). Diese Proteine sind verantwortlich für die Signalübertragung von verschiedenen Zelloberflächenrezeptoren, einschließlich Wachstumsfaktorrezeptoren, Integrine und Haftung anderen Rezeptoren, sieben Transmembran-Guanosin-Phosphat-bindende-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), Zytokin-Rezeptoren, immunologische Erkennungsrezeptoren und Ionenkanäle.

SFKs sind von wesentlicher Bedeutung für viele zelluläre Aktivitäten, einschließlich Änderungen des Zytoskeletts, Differenzierung, Zell-Zyklus-Progression sowie Adhäsion und Migration. Src-Signalisierung spielt eine Schlüsselrolle bei normalen und dysregulierten Knochenfunktionen und ist für den gesunden Knochenumsatz wesentlich. (Fizazi 2007)

Zerstörung des c-Src-Kinasegens führt zu einer Störung bei der Adhäsion und Motilität der Riesenzelle und somit zu einer verminderten Knochenresorption. (Miyazaki 2004)

Obwohl Src-Kinasen ubiquitär exprimiert werden wirkt sich die gezielte Zerstörung des Src-Gens bei Mäusen nur auf die Knochenentwicklung aus; Src-Knockoutmäuse entwickeln Osteopetrosis, überwiegend verursacht von einem Defekt in der durch Osteoklasten vermittelten Knochenresorption und zeigen reduzierte Osteoklastenmigration und andere funktionelle Mängel. (Fizazi 2007)

Die Src-Kinase-Aktivität ist von wesentlicher Bedeutung für die Organisation des Zytoskeletts der Osteoklasten und die Knochenresorption. Src und SFKs (Src family kinases) sind in der antiapoptotischen Signalisierung von RANKL und anderen Mitgliedern der Tumornekrosefaktorfamilie in Osteoklasten involviert. Src-Hemmer reduzieren die Zahl der Osteoklasten, induzieren Apoptose und beeinträchtigen osteoklastäre Knochenresorption, sowie die Adhäsion und Reorganisation des Zytoskeletts. (Fizazi 2007)

Src ist die am häufigsten studierte Kinase der SFKs, obwohl alle Familienmitglieder ähnliche strukturelle Merkmale haben. Src ist ein 60kDa-Protein, bestehend aus verschiedenen funktionalen Regionen, die jeweils eine unterschiedliche Src Homologie (SH) Domain beinhalten.



Abbildung 2: schematische Darstellung der Struktur der Src-Kinase. Erläuterung siehe Text.

Die amino-terminale Region umfasst eine SH4 Domain, die Signale für die Lipidmodifikation beinhaltet und eine einzigartige, für jede SFK spezielle Region mit niedriger Konservierung, von der man annimmt, Proteinwechselwirkungen zu vermitteln. In diesem Zusammenhang sind SH3- und SH2-Domänen zu erwähnen, die auch Proteine binden und eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Src-Aktivität spielen. Eine katalytische Domäne (SH1) ist für die Tyrosin-Kinase-Aktivität zuständig und am kurzen carboxyterminalen Schwanz gebunden, welcher einen negativ regulatorischen Tyrosin-Rückstand beinhaltet (im menschlichen Protein: Y530). Ist Src inaktiv, bindet die SH2-Domäne am phosphorylierten Y530 und die SH3-Domäne an die katalytische Domäne, so dass eine geschlossene Konformation entsteht, die die Kinase-Aktivität verhindert (Abbildung 3). (Fizazi 2007)

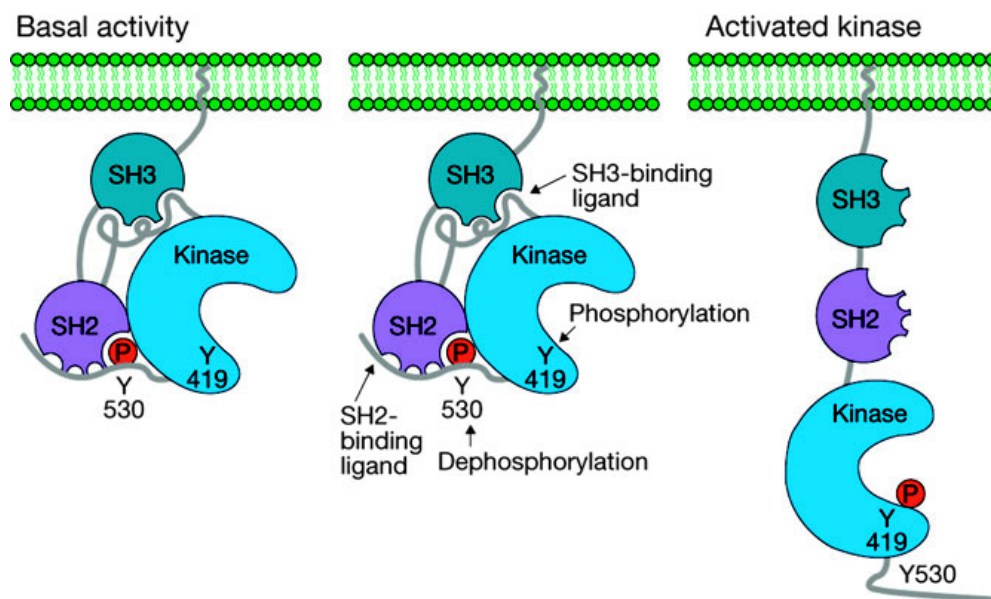


Abbildung 3: Aktivierung von Src. Der linke Bereich repräsentiert die geschlossene oder inaktive Konformation der Src-Kinase, in denen Y530 mit der SH2-Domäne interagiert und die SH3-Domäne so positioniert, dass diese mit dem Linker zwischen der SH2- und der katalytischen Domäne interagiert. Dies führt zum verminderten Zugang von Substrat zur Kinasedomäne. In der Mitte werden verschiedene Mechanismen bei der Aktivierung von Src gezeigt (durch Pfeile angezeigt). Rechts sieht man die offene oder aktive Konformation.

Die Phosphorylierung von Y530 wird von regulatorischen Proteinen, der C-terminal Src-Kinase (Csk) und der Csk-homologen Kinasen, gesteuert. Src kann durch die Bindung von ligandgebundenen Zell-Oberflächen-Rezeptoren oder durch zytoplasmatische Proteinen, wie die zentralen Adhesions Kinasen (focal adhesion kinase, FAK) oder ihrem molekularen Partner, dem Crk-assoziierten Substrat (CAS) aktiviert werden. Die Bindung unterbricht die intramolekularen Wechselwirkungen mit dem Src-Protein und führt zu einer offenen Konformation, die es SH2 und SH3-Domänen ermöglicht, an nachgeschaltete Proteine und der katalytischen Domäne zu binden um Interaktionen mit potentiellen Substraten einzugehen.

Dephosphorylierung von Y530 durch zelluläre Phosphatasen kann auch zur Src Aktivierung führen. Volle Aktivierung erfordert die Autophosphorylierung von Tyrosin-Resten in der katalytischen Domäne (im menschlichen Protein: Y419). (Fizazi 2007)

Src-Kinasen werden ubiquitär exprimiert, jedoch findet man sie gehäuft in Osteoklasten und dort in den Podosomen. Podosomen sind hochdynamische, aktinhaltige Adhäsionsstrukturen, die bisher in Osteoklasten, Makrophagen und in von Rous Sarkoma Viren (RSV) transformierten Fibroblasten gefunden wurden. (Bruzzaniti et al., 2005)

Die Haftung der Osteoklasten an die Knochenmatrix ist für die Knochenresorption obligatorisch. Bei Kontakt von Osteoklasten mit der Knochenoberfläche werden eine Zell-Polarisation und die Organisation der für die Resorption relevanten Strukturen induziert, der so genannten "ruffled border." Zell-Matrix-Interaktion in Osteoklasten ist ein komplexes Phänomen, das aus der Bildung von der sogenannten "clear zone", einer zytoplasmatischen Region, die die anhaftende Membran oder "sealing membrane" präsentiert, resultiert. Adhäsion auf dieser Ebene erfolgt über spezielle Strukturen, den "Podosomen." Podosomen sind dynamische Elemente, die die funktionellen Anforderungen der Zelle regulieren. Ihre Montage erhöht sich während der Knochenresorption und wird vom cytosolisch freiem Calcium und der Aktivität der Proteinkinase C geregelt. (Teti et al., 1991)

Nach der Arrangierung der Integrine (siehe Abbildung 4) mit Proteinen der extrazellulären Matrix unterziehen sich Osteoklasten einer Reorganisation des Zytoskeletts und der zellulären Polarisation, was zur Bildung von unterschiedlichen apikalen und basolateral Membran-Domänen führt. (Baron et al., 1996)

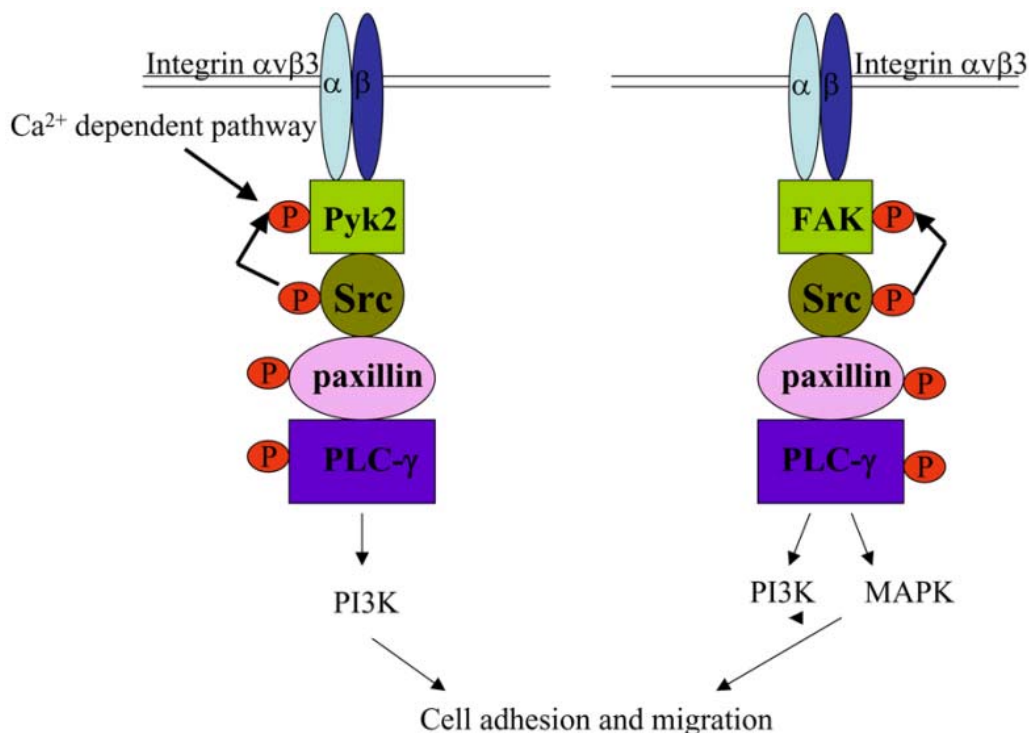


Abbildung 4: Integrin Signalwege durch Pyk2 oder FAK. In Reaktion auf die Aktivierung von $\alpha_v\beta_3$ durch Integrin werden Pyk2 und/oder FAK zu einem Signalkomplex rekrutiert, der aus Src, Paxillin und PLC- γ besteht. Pyk2 kann durch Src oder andere Ca^{2+} abhängige Wege phosphoryliert werden, während FAK durch Src phosphoryliert wird. Beide, Pyk2 und FAK, können zur Aktivierung der PI3K und/oder MAPK führen, was zu einer Zelladhäsion und Migration führt. (Shahrara et al., 2007)

Nach dem Kontakt mit Integrin rekrutiert Pyk2 Src (siehe Abbildung 4) und den Proteinadapter Cbl, bildet einen molekularen Signalkomplex, der von entscheidender Bedeutung für die Zellwanderung ist. Zerstörung eines

beliebigen Moleküls in diesem Komplex stört die Bildung des Podosomenrings und/oder vermindert Osteoklastenmigration. (Bruzzaniti, et al. 2005)

Die Stärke der adhesiven Kräfte zwischen $\alpha_v\beta_3$ Untereinheit und der extrazellulären Matrix kann z.B.: durch Dynamin, ein Substrat der Tyrosinkinase Src, geregelt werden und ist somit für die Funktion der Osteoklastenaktivität essentiell. (Bruzzaniti, et al. 2005)

Dadurch entsteht eine Dichtezunahme des Knochens mit verminderter Elastizität. Eine Markhöhle ist kaum ausgebildet. Es ist eine Neigung zu Frakturen zu beobachten.

Diese Krankheit wird als Marmorknochen- bzw. Albers-Schönberg-Krankheit bezeichnet, welcher diese Krankheit das erste Mal im Jahr 1904 beschrieb. (medinfo.de 2004)

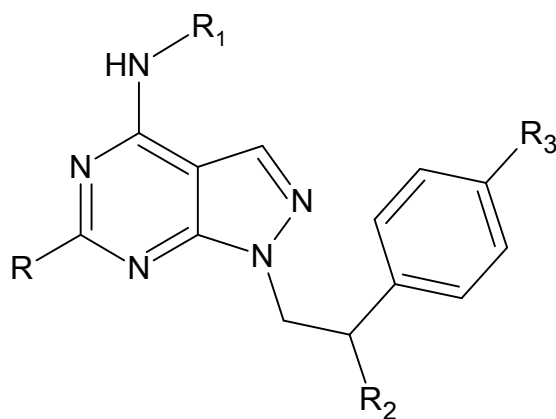
1.1.4 Das Bone-Remodeling

Der Umbau des Knochens findet während des ganzen Lebens statt und findet seinen Sinn einerseits in biochemischen Prozessen, wie zum Beispiel der Calciumhomöostase, andererseits in der lebenslangen Adaption des Knochens an die täglichen mechanischen Bedürfnisse. Dementsprechend besteht im gesunden Muskel-Knochen-Regelkreis ein linearer Zusammenhang zwischen Muskelquerschnittsfläche und Knochenquerschnittsfläche. (Frost 1997)

Während bis zur Pubertät Knochenaufbau und -fertigstellung überwiegen (Modelling), stehen nach der Pubertät knochenerhaltende Austauschprozesse (Remodelling) im Vordergrund. Bis zu 20% des Knochens werden jährlich ausgetauscht. Osteoblasten und Osteoklasten sind beim Knochenumbau im gesunden Körper im Gleichgewicht. Der Knochenumbau wird durch die Osteoblasten gesteuert, aber auch die mechanische Beanspruchung des Knochens ist von Einfluss (z.B. durch Sport, Arbeit). Zusätzlich regulieren Hormone den Knochenstoffwechsel, vor allem Parathormon, Calcitonin sowie die Sexualhormone Östrogen und Testosteron.

1.2 Ziel der Diplomarbeit

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurde die Beeinflussung der Aktivität und Funktionalität von Osteoklasten durch SI83, SI20, S7, S13 und S31 untersucht. Hierbei handelt es sich um stickstoffhaltige Heterocyclen mit einem Pyrazolo[3,4-d]pyrimidin Grundgerüst. Die detaillierte Struktur ist in Tabelle 1 ersichtlich.



	R	R ₁	R ₂	R ₃
SI83	MeS	<i>m</i> -Cl-C ₆ H ₅	Cl	H
S7	H	C ₄ H ₉	Cl	H
SI20	EtS	C ₄ H ₉	Cl	H
S13	H	C ₆ H ₅ CH ₂	Cl	H
S31	H	<i>m</i> -Cl-C ₆ H ₄ CH ₂	Cl	Cl

Tabb: 1: Chemische Struktur von SI83, SI20, S7, S13 und S31

Im ersten Schritt wurde die Beeinflussung der Resorptionsaktivität untersucht. Dazu wurde eine Osteblasten-Knochemark-Co-Kultur für einen Pit-assay mit Toliudinblaufärbung als Versuchsanordnung gewählt.

Im zweiten Schritt wurde der Einfluss von S13 und S31 auf das Apoptoseverhalten und die Zytoskelettbildung von Osteoklasten bestimmt. Als Versuchsanordnung wurde ebenfalls eine Osteoblasten-Knochemark-Co-Kultur allerdings mit anschließender TRAP- bzw. Rhodamin-Dapi-Färbung gewählt.

2 Materialien und Methodik

2.1 Verwendete Materialien und Geräte

Materialien und Geräte	Firma
Computer	Apple PowerMac
	Dell
Inkubator	Fa. Kendor HERA Cell 240
Knochensäge	Fa. Bühler Isomet low speed saw
Kulturplatten	Fa. Iwaki und Fa. Greiner
Mikroskop	Fa. Nikon Ophthiphot-2-OD
	Fa. Olympus BX51
Schüttler	Fa. Edmund Bühler Swip
Vortexer	Fa. Bender & Hobein AG Vortex Genie 2
Wasserbad	Fa. Aigner GFL 1066
Ultraschallbad	Fa. Elma, Transsonic 570
Laminar Airflow Werkbank	Fa. Ehret
Einwegspritze	Terumo Syringe
Injektionsnadeln	Luer/NSP, Rose GmbH
Petrischalen	Fa. Iwaki; Fa. Sterilin
Zentrifuge	Fa. Bartelt, HERMLE Z323K
Videokamera	Fa. Sony, DXC-151-AP
Silikonfett	Fa. Bayer-Silicone

2.2 Verwendete Substanzen, Puffer und Farbstofflösungen

Substanz	Firma
α -MEM	Fa. Gibco BRL
FCS	Fa. PAA
Penicillin-Streptomycin	Fa. Gibco BRL
Osteoblasten	Eigenproduktion
DMSO	Fa. Merck
Knochenmark	Eigenproduktion
$1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D ₃	Fa. Hoffmann-La Roche
PGE ₂	Fa. Cayman
Isopropanol 70%	Fa. Riedel-de Haen
Formaldehyd 10%	Fa. Merck
Aqua.dest	Eigenproduktion
Rhodamin-Phalloidin	Molecular Probes
Aceton	Fa. Riedel-de Haen
Dapi	Molecular Probes
<i>fast red violet salt</i>	Fa. Sigma

TRAP-Puffer

Natriumacetat 0,65 g

Natriumtartrat 0,27 g

Aqua.dest 120 ml

Natriumacetat im Wasser lösen und pH = 5 einstellen, anschließend Natriumtartrat hinzufügen.

Färbelösung

Naphthol AS-MX-Phosphat 5,4 mg

N,N-Dimethylformamid 540 μ l

Fast Red Violet Salt 32,4 mg

TRAP-Puffer 54 ml

Naphthol AS-MX-Phosphat in N,N-Dimethylformamid lösen, Fast Red Violett Salt in TRAP-Puffer lösen und hinzugeben. Gut durchmischen.

PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$

CaCl_2	1,0 g
KCl	2,0 g
KH_2PO_4	2,0 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,0 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	14,3 g
NaCl	80,0 g

Alle Salze außer CaCl_2 werden in Aqua.bidest gelöst, anschließend wird HCl zugesetzt, bis ein pH-Wert von 2-3 erreicht wird. Nach dem Lösen des CaCl_2 wird auf 1 l aufgefüllt. danach wird 1:10 verdünnt und mit 5 N NaOH auf pH = 7,2 gebracht.

Toluidinblau

Toluidinblau	1 g
Na-Borat	1 g
Aqua.dest	98 g

Die Substanzen werden im Wasser gelöst.

Natriumazid 500x

NaN_3	0,1 g
Aqua.dest	1 ml

Die Substanz wird im Wasser gelöst.

2.3 Methodik

Osteoblasten-Knochenmark-Co-Kultur

Zur Bestimmung der Osteoklastenaktivität wurde der Pit-Assay gewählt.

Hierbei wurden Osteoblasten und Knochenmark auf Knochenblättchen co-kultiviert (Osteoblasten-Knochemark-Co-Kultur), was die Differenzierung und Fusion von Präkursorzellen zu reifen und aktiven Osteoklasten gewährleisten

soll. Die Co-Kultur wurde mit verschiedenen Konzentrationen der Wirkstoffe behandelt, um die Aktivität der Osteoklasten zu beeinflussen. Anschließend wurden die Knochenplättchen mit Toluidinblau gefärbt, um die Resorptionslakunen für die Auswertung am Mikroskop besser sichtbar zu machen. Im letzten Schritt wurde anhand der Größe dieser Lakunen auf die Aktivität der Osteoklasten rückgeschlossen. Die Größe der Resorptionslakunen, auch Pitts genannt, wurde vermessen und statistisch ausgewertet.

TRAP- und Rhodamin-Dapi-Färbung

Zur Bestimmung der Beeinflussung des Zytoskeletts und des Apoptoseverhaltens von Osteoklasten durch die Wirkstoffe wurde eine Osteoblasten-Knochenmark-Co-Kultur auf Deckgläser bzw. direkt auf der Mikrotiterplatte ausgesät. Nach der visuellen Zählung erfolgte die statistische Auswertung analog den Pit-Assay.

2.3.1 Bestimmung der Resorptionsaktivität von Osteoklasten („Pit-Assay“)

2.3.1.1 Durchführung der Osteoblasten-Knochenmark-Co-Kultur

Knochenplättchen

Die Osteoblasten-Knochenmark-Co-Kultur wurde auf Knochenplättchen durchgeführt. Diese wurden aus dem diaphysealen Teil eines Rinderknochens gewonnen. Dazu wurde der Knochen vom Mark befreit, mit 100% Alkohol gereinigt und anschließend bei 50 °C 24 Stunden lang getrocknet. Eine weitere Lagerung erfolgt im Kühlschrank bei 4 °C.

Mit der Knochensäge wurden ca. 300 µm dicke Scheiben abgeschnitten, die mit einem Skalpell oder Schere vom Rand befreit und in Rechtecke mit ca. 3-5 mm Kantenlänge geschnitten werden.

Die Reinigung erfolgte im Ultraschallbad dreimal mit WEK und einmal mit 70% Alkohol je 5 Minuten.

Ab hier wurde im sterilen Raum weitergearbeitet.

Zur Sterilisation wurden die Plättchen im Laminar Flow pro Seite 15 Minuten lang UV-bestrahlt.

Die so bereiteten Plättchen wurden mit sterilem Silikonfett in eine 48er-Well-Kulturplatte zu je vier Stück pro Well unter sterilen Bedingungen eingeklebt.

Vorinkubation

Für die Vorinkubation wurde jedes Well mit 0,5 ml mit α -MEM + 10% FCS-hi + 1% Penicillin-Streptomycin bestückt und im Inkubator bei 37° C und 5% CO₂ mindestens 2 h lang bebrütet.

Osteoblastenaussaat

Zur Osteoblastenaussaat wurden primäre Zellen verwendet, die aus Calvarien ein bis drei Tage alter Mäuse isoliert und bis zu ihrer Verwendung in flüssigen Stickstoff gelagert werden.

Die Osteoblasten wurden im Wasserbad aufgetaut und, da die Zellen in DMSO gelagert werden, welches toxisch für Zellen ist, baldigst mit α -MEM + 10% FCS-hi + 1% Penicillin-Streptomycin auf folgende Konzentration verdünnt:

ca. 17000 Zellen / 1 ml Medium

Das Medium zur Vorinkubation wurde von den Knochenplättchen abgesaugt und die Osteoblastensuspension unmittelbar anschließend ausgesät (0,5 ml / Well einer 48er Platte) und im Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach mindestens 3 Stunden sollten sich die Osteoblasten weitgehend am Boden festgesetzt haben. Dies wurde mit einem Blick durch das Mikroskop kontrolliert.

Zugabe der Knochenmarkskultur

Das Knochenmark wurde aus dem Femur von Mäusen isoliert. Aus den präparierten Oberschenkelknochen wurde das Mark mit einer 1-ml-Einwegspritze (0,3x12 Nadel) in eine mit α -MEM + 10% FCS-BM + 1% Penicillin-Streptomycin gefüllte Petrischale dispergiert und bei 4 °C und

1500 rpm fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet wurde resuspendiert und in 9,6 ml α -MEM + 10% FCS-BM + 1% Penicillin-Streptomycin suspendiert. Bei diesem Schritt gilt es allgemein eine Verdünnung von 4,8 ml Medium pro Femur einzuhalten.

Von dieser Suspension wurden 0,4 ml / Well einer 48er Platte aufgetragen. Zur Stimulierung der Osteoblastendifferenzierung wurde noch $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D₃ und PGE₂ in folgenden Konzentrationen hinzugefügt:

PGE ₂	1 μ M
$1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D ₃	1 nM

Die Kultur wurde zwei Tage lang bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Mediumwechsel

Das alte Medium wurde abgesaugt und durch 0,5 ml α -MEM + 10% FCS-BM + 1% Penicillin-Streptomycin mit analogen Konzentrationen an $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D₃ und PGE₂ ersetzt.

Die Kultur wurde für einen weiteren Tag bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Substanzzugabe

Für die Substanzzugabe wurde zunächst ein Medium, wie bei 'Mediumwechsel' beschrieben, verwendet. Es wurden 0,5 ml Medium pro Well gerechnet und zwei Well pro Substanzkonzentration, wobei die Substanzen in folgenden Konzentrationen zugefügt wurden:

10 μ M	1 μ M	0,1 μ M	0,01 μ M
------------	-----------	-------------	--------------

Pro Kulturplatte wurden vier Wells zur Kontrolle herangezogen:

Zwei Wells mit reinem α -MEM + 10% FCS-BM + 1% Penicillin-Streptomycin

Zwei Wells mit α -MEM + 10% FCS-BM + 1% Penicillin-Streptomycin und DMSO in derselben Konzentration wie bei den Substanzzugaben.

Die Kontrollgruppe mit DMSO ist notwendig und sinnvoll, da die Wirkstoffe in DMSO gelöst sind, welches die Osteoklasten in ihrer Aktivität beeinflusst. Durch die Zugabe von DMSO in die Kontrollgruppe wird der Einfluss des Lösungsmittels miteinbezogen.

Die so bereitete Kulturplatte wurde zwei Tage lang bei 30 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach erfolgter Inkubation wurde je ein Knochenplättchen aus den Kontrollgruppen C und DMSO entnommen, 15 Minuten lang in Isopropanol (70%) im Ultraschallbad gereinigt, mit Toluidinblaulösung (Details siehe 2.3.1.2) gefärbt und im Mikroskop begutachtet. Sind die Resorptionslakunen in gewünschter Größe und Anzahl vorhanden wurde der Versuch beendet. Mit den übrigen Knochenplättchen wurde ebenso verfahren.

Sind noch zu wenig und zu kleine Lakunen vorhanden, kann der Versuch noch einen Tag fortgesetzt werden. In diesem Fall wurden die zwei bereits gefärbten Plättchen in die Auswertung nicht miteinbezogen.

Die ultraschallgereinigten Knochenplättchen sind gefärbt oder auch ungefärbt unbegrenzt lagerbar.

Den genauen zeitlichen Ablauf einer Co-Kultur veranschaulicht folgende Graphik:

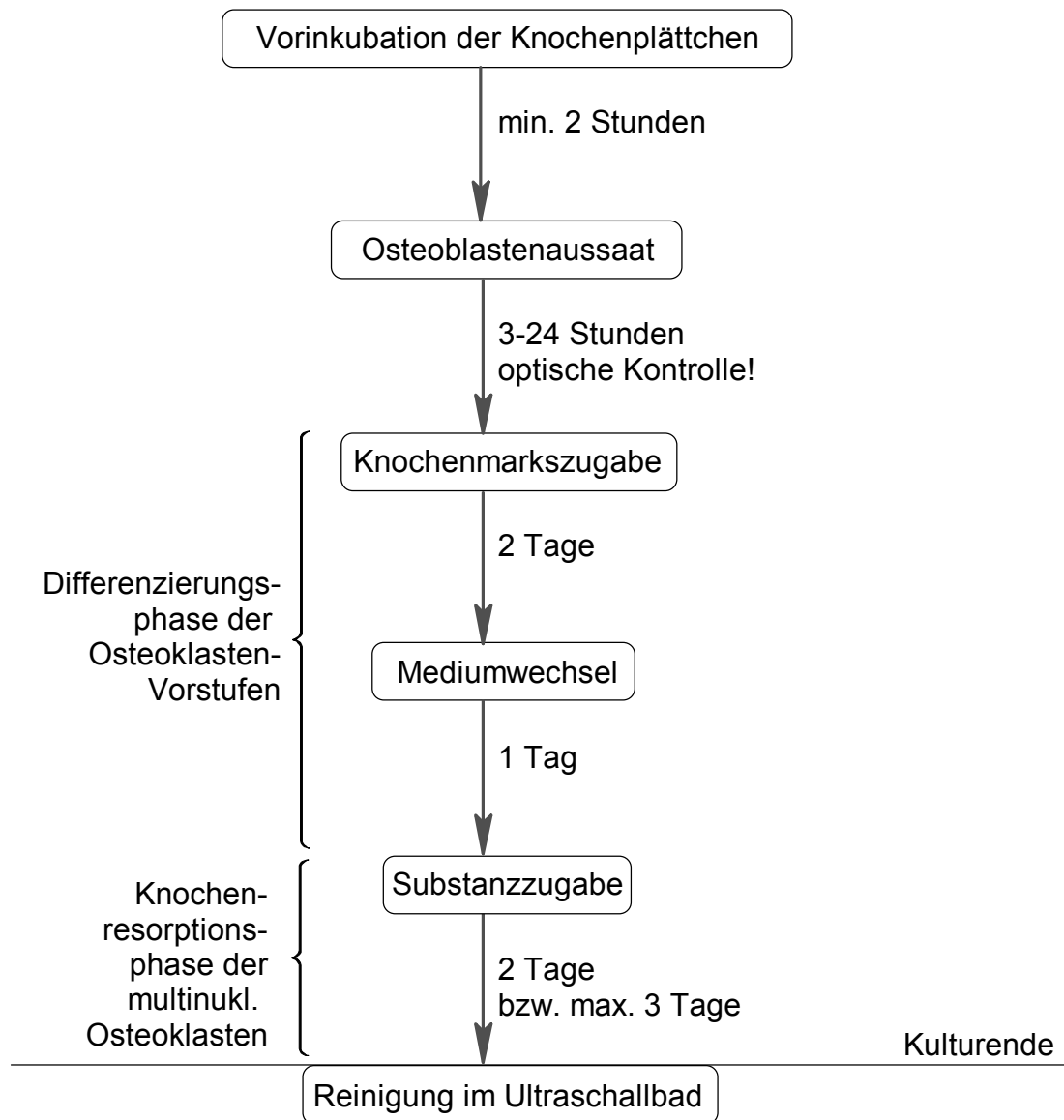


Abbildung 5: Zeitschema der verwendeten Co-Kultur

2.3.1.2 Durchführung der Toluidinblaufärbung

Die nunmehr im Ultraschallbad gereinigten Knochenplättchen wurden nach Konzentrationen getrennt und in Toluidinblaulösung vier Minuten lang geschüttelt. Zur Reinigung werden die Plättchen mehrmals in H₂O geschwenkt und anschließend getrocknet.

2.3.2 Auswertungen

2.3.2.1 Auswertung mit Nikon/Photoshop/NIH-Image

Von jedem Knochenplättchen wurden mit Win TV2K 5 Fotos (a-e) gemacht, die sich nicht überlappen dürfen.

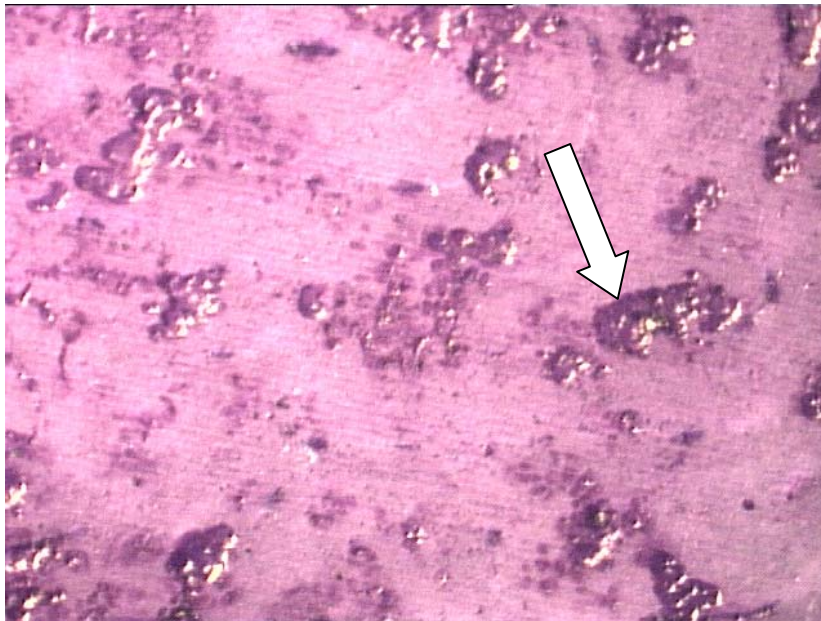


Abbildung 6: Eine von 5 Photographien von einem Knochenplättchen, der Pfeil zeigt auf eine Resorptionslakune

Bei den Photographien (siehe Abbildung) wurde mit dem Bildbearbeitungsprogramm Photoshop® (Adobe®) die Resorptionslakunen nachgezeichnet und mit NIH-Image die Flächen ausgerechnet. Die Daten werden mit Excel® (Microsoft®) vereinheitlicht und mit StatView® hinsichtlich des Fisher-PLSD-Tests ausgewertet.

2.3.2.2 Auswertung mit Olympus/Cell^F

Von jedem Knochenplättchen wurden zwei Fotos mit dem zum Mikroskop gehörigen Programm Cell^F® gemacht und mit ebendiesem zusammengefügt, sodass meist das gesamte Plättchen zu sehen ist. Die Resorptionslakunen

werden automatisch markiert und nach händischer Kontrolle die Flächen berechnet. Die Daten werden wieder mit Excel[®] (Microsoft[®]) vereinheitlicht und mit StatView[®] hinsichtlich des Fisher-PLSD-Tests ausgewertet.

2.3.3 Validierung der Auswertemethoden

2.3.3.1 Validierung der ausgewerteten Flächen

Auswertung mit Olympus/Photoshop/NIH-Image

Bei dieser Methode wurden mit dem Mikroskop der Fa. Nikon[®] 5 Fotos pro Knochenplättchen mit 10facher Vergrößerung nachdem aus der Abbildung 6 erkennbarem Schema gemacht.

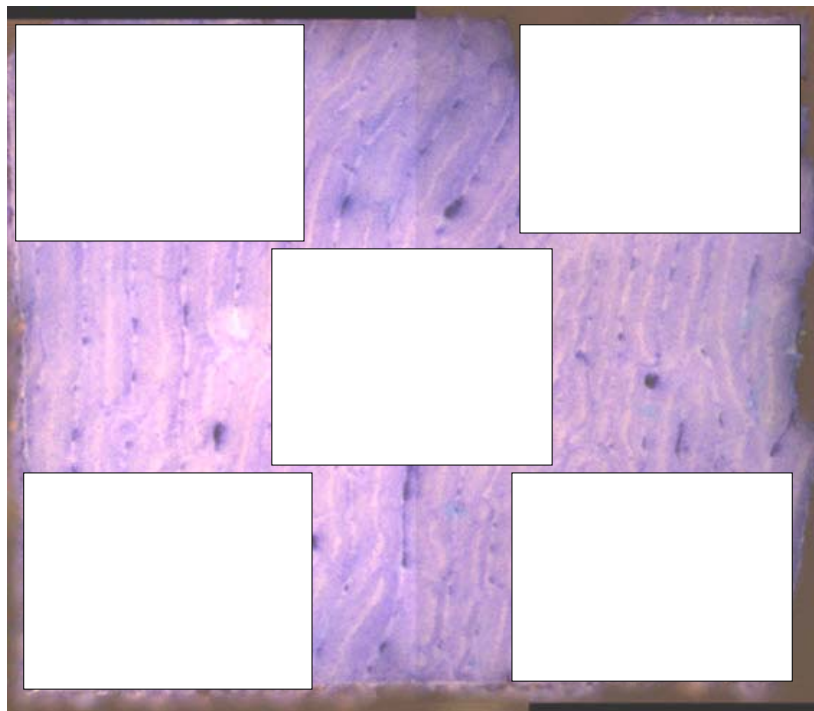


Abbildung 7: Fotografierschema eines Knochenplättchens: Die fünf Aufnahmen wurden so gelegt, dass sie sich nicht überschneiden und möglichst viel Randpartien beinhalten.

Nachfolgende Aufnahmen eines Eichmillimeters zeigen die exakten Ausmaße einer Aufnahme.

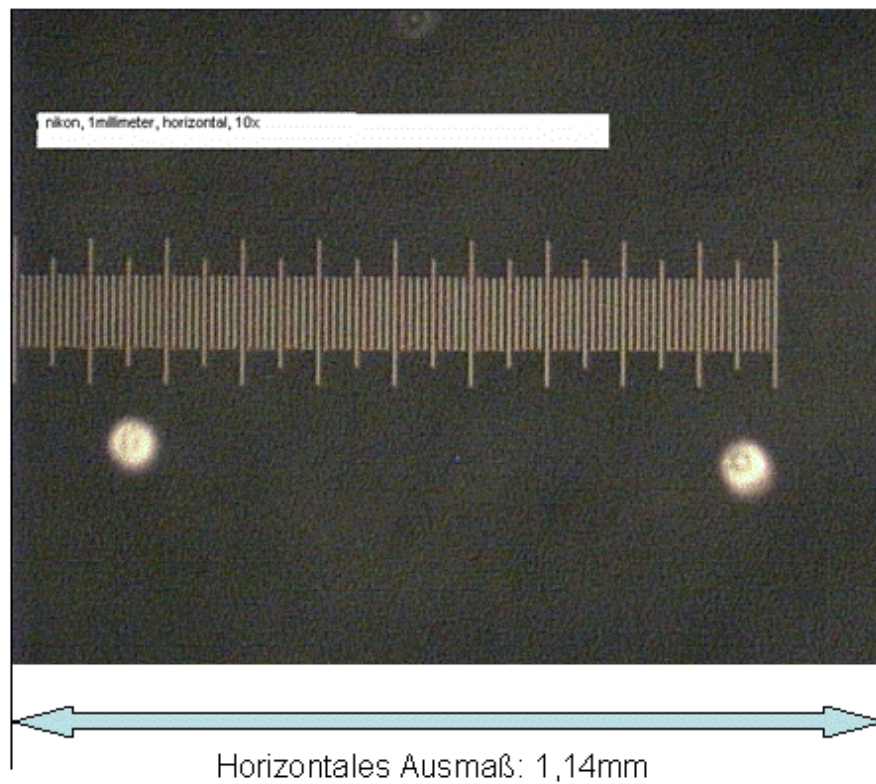


Abbildung 8: Aufnahme eines Eichmillimeters horizontal mit Nikon Ophthot-2-OD in 10facher Vergrößerung

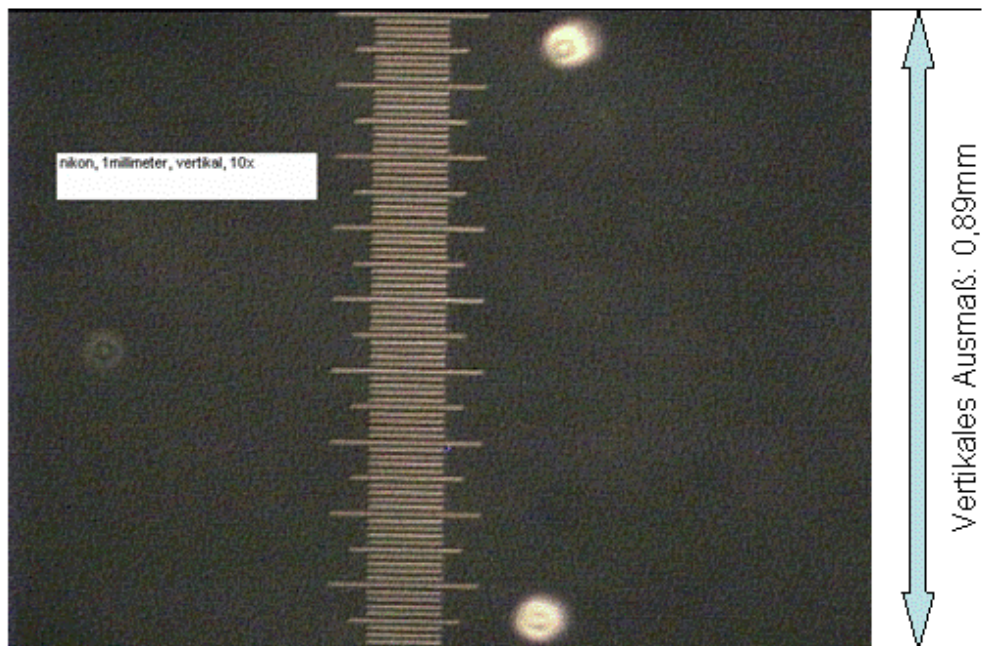


Abbildung 9: Aufnahme eines Eichmillimeters vertikal mit Nikon Ophthot-2-OD in 10facher Vergrößerung

Somit ergeben sich folgende Maße für ein Foto:

vertikal	0,89 mm
horizontal	1,14 mm
Fläche	1,0146 mm ²

Aus den 5 aufgenommen Fotos ergibt sich eine auszuwertende Fläche von 5,073 mm² pro Knochenplättchen. Bei einer Knochenplättchengröße von ca. 9-15 mm² wurde demnach 30-55% der gesamten Fläche eines Plättchens ausgewertet.

Auswertung mit Olympus/Cell^F

Mit dem Olympus BX 51 wurde mit 5facher Vergrößerung gearbeitet, 2 Fotos zusammengefügt und unter optimaler Ausnutzung des größtmöglichen Ausschnittes, welcher 11,5 mm² beträgt, so viel wie möglich vom Knochenplättchen erfasst, was in Abbildung 9 gut zu erkennen ist.

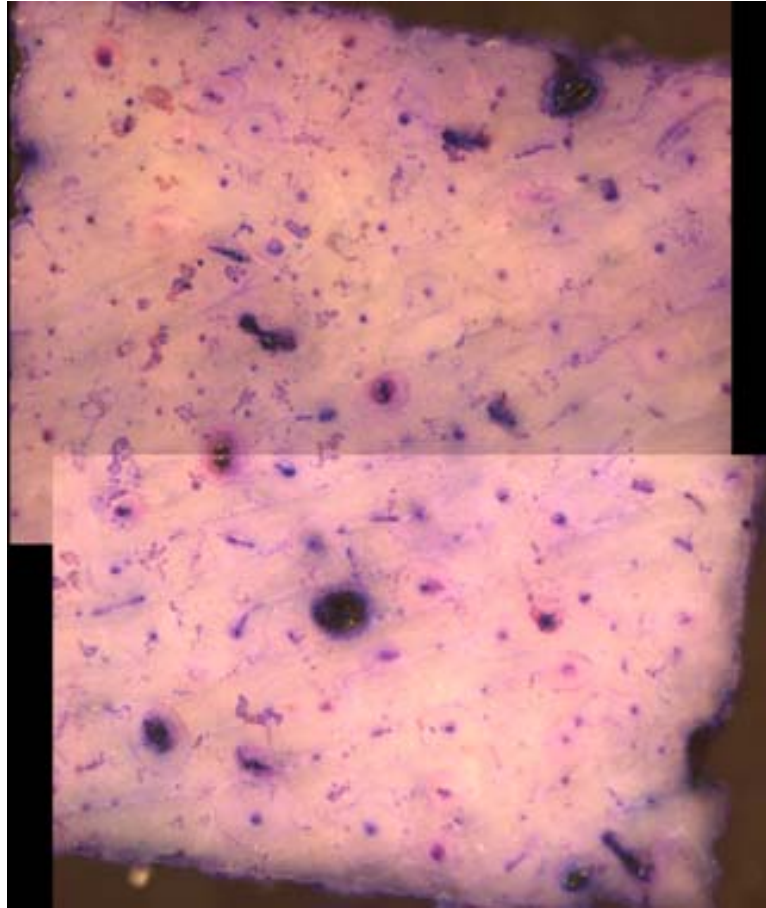


Abbildung 10: 2 Fotos in 5facher Vergrößerung, die mit Cell^F zusammengefügt wurden. Gut zu erkennen sind der überlappende Bereich und die Randbereiche, die vom Plättchen nicht mehr ausgefüllt werden.

Nach Abzug der überlappenden Flächen, die ca. bis zu $1,5 \text{ mm}^2$ beträgt, ergibt sich eine maximal auszuwertende Fläche von rund 10 mm^2 , was ca. 65-100% einer Plättchenfläche entspricht.

Für das Plättchen in Abbildung 9 errechnete Cell^F aufgrund der abzuziehenden Randbereiche und überlappenden Bereiche in der Bildmitte eine Gesamtfläche von $8,8 \text{ mm}^2$.

Diskussion und Übersichtstabelle

	Olympus/Photoshop/NIH-Image	Olympus/Cell [^] F
gesamt fotografierte Fläche/Plättchen in mm ²	5,073 mm ²	max. 11,5 mm ²
ausgewertete Fläche in % zur ges. Plättchenfläche	30-55%	65-100%

Tabelle 2: Überblick über die ausgewerteten Flächen der beiden Auswertemethoden.

Mit der Methode Olympus/Cell[^]F wurde je nach Größe des Knochenplättchens max. doppelt so viel Fläche ausgewertet als mit Nikon/Photoshop/NIH.

2.3.3.2 Validierung der Auswertemethoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 3 Substanzgruppen eines Versuches mit beiden Methoden ausgewertet.

Kalibrierung von Olympus BX51 mit drei Treatments von 37-06

Auswertung mit Nikon/Photoshop/NIH

Control	2.10	11.32	9.28	0.00	7.26	6.31		
PP2 1 μ M	2.43	0.91	4.32	6.10	1.20	9.48	1.28	1.58
PP2 0,01 μ M	0.38	1.60	1.75	0.87	3.94	1.88	2.64	1.11

X Labels	Data Set-A		
X	Y	SEM	N
Control	6.04	1.75	6
PP2 1 μ M	3.41	1.08	8
PP2 0,01 μ M	1.77	0.39	8

Auswertung mit Olympus BX51/Cell

Control	2.88	8.52	6.72	0.00	8.29	4.14		
PP2 1 μ M	3.10	0.77	4.85	6.10	1.82	2.55	10.99	2.06
PP2 0,01 μ M	0.12	1.06	2.20	1.30	4.32	2.42	1.88	0.39

X Labels	Data Set-A		
X	Y	SEM	N
Control	5.09	1.37	6
PP2 1 μ M	4.03	1.16	8
PP2 0,01 μ M	1.71	0.47	8

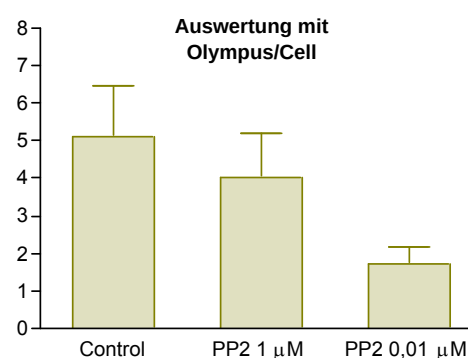
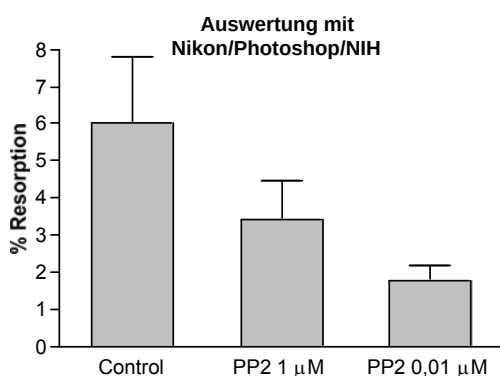


Abbildung 11: Auswertung von drei Substanzgruppen mit beiden Auswertemethoden

Diskussion

Die beiden Methoden zeigten bezüglich der Qualität der Auswertungen kaum Unterschiede.

Unter Einbeziehung der Tatsache, dass bei Olympus/Cell[^]F das ganze Plättchen ausgewertet wird, kann man hierbei von einer objektiven Auswertung sprechen. Hingegen muss die Auswertung mit Nikon/Photoshop/NIH als eine Näherung bezeichnet werden, da die Tatsache, daß die Resorptionslakunen des öfteren nicht gleichmäßig auf das gesamte Plättchen verteilt sind, wie in Abbildung 12 erkennbar, keine Berücksichtigung fand.

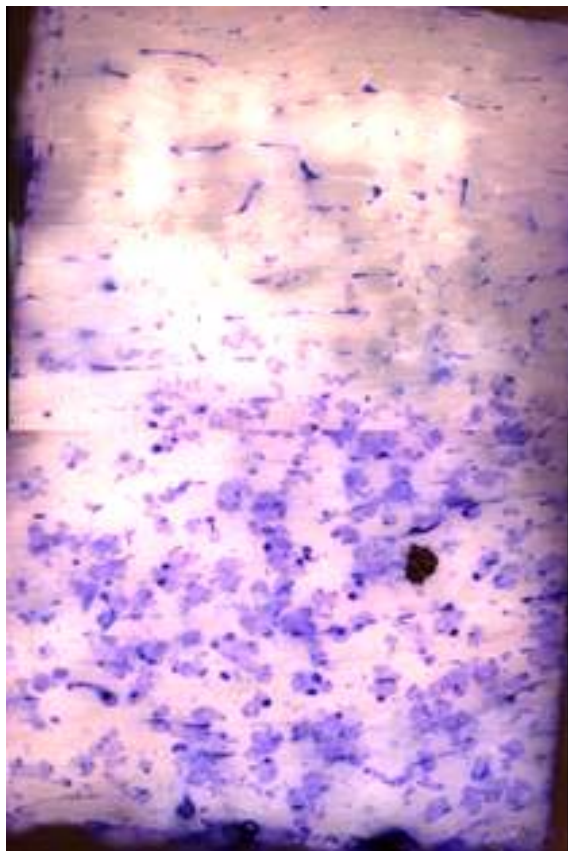


Abbildung 12: Knochentafel mit ungleichmäßiger Pittverteilung. Die Pitts, als violett-bläuliche Flecken gut zu erkennen, konzentrieren sich in der unteren Bildhälfte, leicht rechts.

2.3.3.3 Validierung der Auswertezeit

Auswertung mit Nikon/Photoshop/NIH-Image

Hierbei wurden 2,5x soviel Fotos gemacht als mit Olympus[®]/Cell[^]F[®], aus denen die Pitts händisch nachgezeichnet wurden. Aus den Nachzeichnungen wurde mit NIH-Image[®] die Fläche der Lakunen pro Foto errechnet. Diese Daten wurden händisch in das Programm Excel[®] hinüberkopiert, dort zusammengefasst sowie die prozentuelle Resorptionsfläche pro Plättchen errechnet.

Auswertung mit Olympus/Cell[^]F

Mit 2 Fotos wurde 65-100% eines Plättchens abgebildet. Die Detektion der Pitts erfolgte je nach Beschaffenheit der Plättchen entweder automatisch meist jedoch händisch, was sich in einer deutlich längeren Auswertezeit bemerkbar macht. Die Berechnung der einzelnen Flächen übernahm das Programm Cell[^]F[®] sowie den Transfer der Daten in das Programm Excel[®], wo die prozentuellen Resorptionsflächen errechnet wurden.

Diskussion und Tabelle mit Zeitvergleich

Zeitvergleich der Auswertemethoden		
	Nikon/Photoshop/NIH-Image	Olympus/Cell [^] F
Fotos aufnehmen	♦♦	♦
Pitts nachzeichnen bzw. detektieren	♦♦♦	} ♦♦♦♦
Fläche berechnen	♦♦	
Excel	♦	♦
gesamt	8	6

Tabelle 3: Zeitvergleich der Auswertemethoden bezogen auf ein Knochenplättchen. Zeitfaktor: ♦= wenig; ♦♦♦♦= viel

Das zeitaufwendige Nachzeichnen der Resorptionslakunen entfiel zwar bei Olympus[®]/Cell[^]F[®], jedoch wurde die Zeitersparnis durch das Auswerten der grösseren Fläche wieder wettgemacht. Die Berechnung der Fläche der Resorptionslakunen und der gesamten Plättchenfläche übernahm das Programm Cell[^]F[®] direkt.

Zusammenfassend kann von einer Zeitersparnis je nach Anzahl und Grösse der Pitts von maximal einem Drittel mit dem System Olympus[®]/Cell[^]F[®] gegenüber Nikon[®]/Photoshop[®]/NIH[®] ausgegangen werden.

2.3.4 Bestimmung der Osteoklastengenese mittels TRAP-Färbung

Die *tartrate resistant acid phosphatase* (TRAP) zählt zu den wichtigsten Osteoklasten-Markern, und bietet sich an, Osteoklasten gegenüber anderen Zellen, den sogenannten TRAP-negativen Zellen, unterscheidbar zu machen.

Als Kriterium für einen TRAP-positiven Osteoklasten wurde das Vorhandensein von mindesten drei Zellkernen gesetzt.

Versuchsanordnung

Es wurden Co-Kulturen, wie bei der Durchführung des Pit-Assays beschrieben, auf Deckgläsern in 6er-Mikrotiterplatten mit 3 Wells pro Substanzkonzentration erstellt.

Zellfixierung

Nach Spülen der Deckgläser mit PBS + $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (37° C) unter Lösung und Entfernung der Osteoblastenschicht wurden die Zellen mit 10%iger Formaldehydlösung zuerst 3 und dann 10 Minuten fixiert.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS + $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ wurden die Zellen zur Konservierung mit 4 µl Natriumazid 500x pro Well versetzt, was bei 2 ml pro Well einer Konzentration von 2% entspricht.

Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Platten bei 4 °C gelagert.

Färbung

Die Zellen wurden mit TRAP-Puffer bei 37 °C und 5% CO_2 vorinkubiert und anschließend mit Aceton/Ethanol (1:1) 30 Sekunden lang behandelt.

Für die Färbung wurden die Zellen mit Färbelösung bei 37 °C behandelt, die nach 5-10 Minuten mit Aqua.dest gestoppt wurde.

2.3.4.1 Auswertung

Die gefärbten, mindestens drei-zellkernigen Osteoklasten wurden mit Hilfe einer Zählmaus gezählt und die unterschiedlichen Substanzkonzentrationen gegenüber den Kontrollgruppen wie bei den Pit-assays statistisch ausgewertet.

2.3.5 Bestimmung der Zytoskelettbildung mittels Rhodamin-Dapi-Färbung

Rhodamin-Phalloidin-Färbung

Mit der Rhodamin-Phalloidin-Färbung wurde der Aktinanteil des Zytoskeletts der Osteoklasten sichtbar gemacht, was Rückschlüsse auf die Auswirkungen der Testsubstanzen auf die Zytoskelettbildung erlaubt. Dafür wurden Phallotoxine aus dem Knollenblätterpilz *Amanita phalloides* verwendet, welche sowohl monomeres F-Aktin als auch Aktinfilamente mit hoher Affinität binden.

In nanomolaren Konzentrationen eingesetzt, sind Phallotoxine sehr vorteilhafte Proben für das Markieren, Identifizieren und Quantifizieren sowie das Stabilisieren von F-Aktin in fixierten und permeabilisierten Gewebeschnitten, Zellkulturen oder zellfreien Experimenten. Die Bindung von Phalloidin an Actin erfolgt an der Verbindungsstelle seiner Untereinheiten. Da diese Stelle kaum von actinbindenden Proteinen genutzt wird, ist ein Großteil des F-Actins in Zellen für die Phalloidin-Bindung verfügbar. Diese Eigenschaften machen Phalloidin für die Fluoreszenzmikroskopie wesentlich attraktiver als actinspezifische Antikörper. (kmf-laborchemie.de 2005)

Phallotoxine sind kleine bicyclische Heptapeptide mit einem Molekulargewicht von 789 Dalton, die durch eine Thioetherbrücke ihre innere Ringstruktur erhalten und an einer freien Carboxylgruppe der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin gebunden haben.

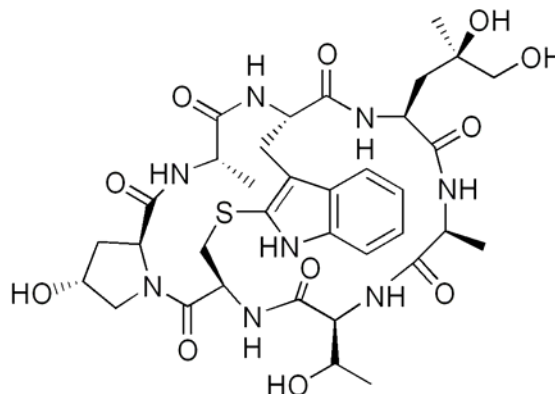


Abbildung 13: Phalloidin, Molekülstruktur

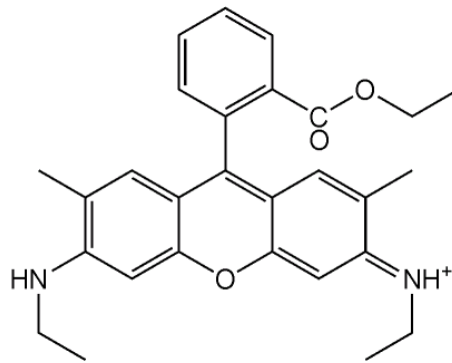


Abbildung 14: Rhodamin 6G, Molekülstruktur

Rhodamine haben wie alle Laserfarbstoffe eine Quantenausbeute nahe 100%. Die Quantenausbeute von Rhodamin 6G ist z. B. 95%, d. h. von 100 absorbierten Photonen werden 95 in Fluoreszenzphotonen umgewandelt. Des Weiteren ist die Wahrscheinlichkeit eines Spinflips (vom Singulettzustand in den Triplettzustand) sehr gering, so dass Rhodamine sich nur selten im langlebigen Triplettzustand befinden, in dem sie nicht fluoreszieren. (Scott 1982)

Das Deckglas wurde in einen Färbetrog transferiert und mit 3 ml eiskaltem Aceton überschichtet. Nach fünf Minuten sind die Zellen permeabel genug, um den Antikörper aufzunehmen.

5 μ l des Antikörpers wurden in einem Eppendorf unter Lichtschutz und Raumtemperatur zur Trockene gebracht, in PBS + $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gelöst, auf das Deckglas aufgebracht und eine halbe Stunde lichtgeschützt inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde mit PBS und Wasser gespült, das Deckglas luftblasenfrei auf einen mit Einbettungsreagenz versehenen Objektträger aufgesetzt, die Ränder mit Klebstoff abgedichtet und lichtgeschützt bei 4° C gelagert.

Dapi-Färbung

Die Auslösung der Apoptose ist am Zellkern zu erkennen, der mit der Dapi-Färbung markiert wurde.

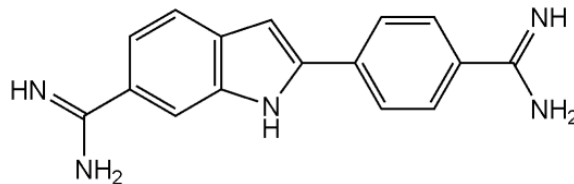


Abbildung 15: DAPI, Molekülstruktur, 4',6-Diamidino-2-phenylindol;

DAPI lagert sich bevorzugt an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA an. Bei Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert DAPI im sichtbaren Bereich mit blauer bis cyaner Farbe.

2.3.5.1 Auswertung

Die Deckgläser wurden mit Immersionsmikroskopie unter Verwendung eines Fluoreszenzobjektivs und DAPI/Fluorescein/*Texasrot* Dreifachfilters ausgewertet, wobei das Zytoskelett rot und die Zellkerne blau zu erkennen sind. Für die Dokumentation werden ausgewählte Zellen fotografiert, wobei auf Besonderheiten wie z.B.: ein unvollständiger Aktinring oder Kernfragmentierungen Wert gelegt wurde.

2.3.6 Statistische Auswertung mit Excel, StatView II und Prism 4

Die Rohdaten werden mit dem Statistikprogramm Excel[®] so zusammengefasst, dass die prozentuellen Resorptionsflächen pro Knochenplättchen vorlagen.

Diese Daten werden mit StatView II[®] hinsichtlich des Fisher PLSD-Tests in den Konfidenzintervallen 95%, 99% und 99,9% untersucht. Tabelle 4 erläutert die verwendeten Signifikanzkriterien.

Fisher PLSD			
Konfidenzintervall	Irrtumswahrscheinlichkeit	Abweichung vom Mittelwert	Bedeutung
95%	p=0,05	$\mu \pm 1,96\sigma$	signifikant
99%	p=0,01	$\mu \pm 2,58\sigma$	sehr signifikant
99,9%	p=0,001	$\mu \pm 3,29\sigma$	hoch signifikant

Tabelle 4: Signifikanzkriterien des Fisher PLSD-Tests; Konfidenzintervall = Vertrauensbereich; μ = Erwartungswert; σ = Standardabweichung (Freie Universität Berlin, 2006)

Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm Prism[®] der Firma GraphPad herangezogen.

3 Ergebnisse

3.1 Austestung der Wirkung von SI83 auf die Resorptionsaktivität von Osteoklasten

Da die Auswirkungen der Substanz SI83 auf die Resorptionsaktivität zum Zeitpunkt dieser Diplomarbeit ausreichend dokumentiert sind, wurde SI83 als interner Standard hinzugezogen. Dazu wurde ein Konzentrationsbereich zwischen 10 μM und 0,01 μM im Vergleich zu Kulturmedium alleine (Control) und Kulturmedium mit DMSO (Contr. + Vehikel) getestet.

Treatment	Resorption absolut	Resorption %	SEM	N
Control	3,18	68,98	1,57	3
Contr. + Vehikel	4,61	100,00	1,25	4
SI83 10 μM	1,01	21,91	0,50	8
SI83 1 μM	3,22	69,85	1,17	8
SI83 0,1 μM	2,39	51,84	1,17	8
SI83 0,01 μM	4,21	91,32	1,49	8

Tabellen 5: Hemmung der Osteoklastenaktivität durch SI83; Treatment = Substanzzugabe inkl. Konzentrationsangabe, Resorption absolut = Mittelwert der prozentuell resorbierten Fläche pro Plättchen, Resorption % = Resorption prozentuell zu Contr. + Vehikel (= 100%), SEM = Standardabweichung, n = Anzahl der Knochenplättchen

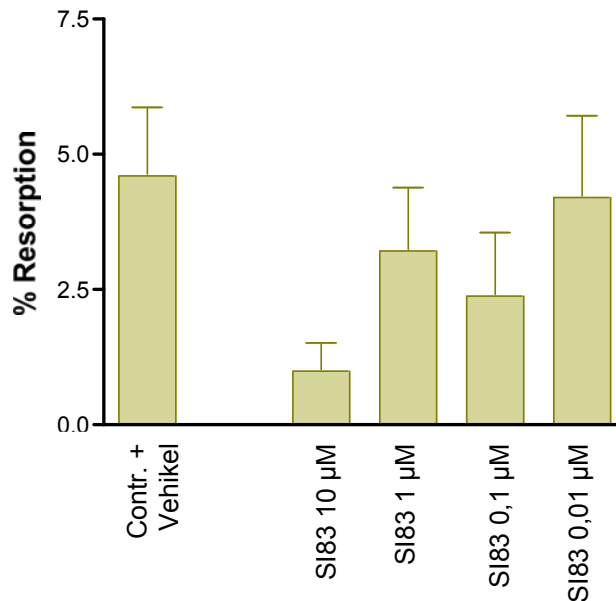


Abbildung 16: Hemmung der Osteoklastenaktivität durch SI83, keine Signifikanzen

Das Kulturmedium alleine zeigt eine Resorption von 3,18%, im Konzentrationsbereich von 10 µM bis 0,01 µM gab es keine Signifikanz mit den Kontrollgruppen.

Der Hemmbereich der Substanz liegt zwischen den Konzentrationen 10 µM und 0,01 µM. Die Hemmung ist in der niedrigsten Konzentration gering und korreliert nicht linear mit den verwendeten Konzentrationen. Es zeigte sich anhand des Fisher-PLSD-Tests keine Signifikanz. Dieses Experiment etabliert die Wirkung von SI83 für die nachstehenden Versuchsreihen mit anderen Tyrosinkinasehemmern.

3.2 Austestung der Wirkung von S7 und SI20 auf die Resorptionsaktivität von Osteoklasten

Hier wurde in 3 Versuchen die Auswirkungen der Substanzen S7 und SI20 auf die Resorptionsaktivität von Osteoklasten dargestellt.

Für diese Substanzen wurde der Konzentrationsbereich wie im obigen Versuch mit SI83 ebenfalls zwischen 10 µM und 0,01 µM gewählt.

Also Referenz diente ebenfalls wieder Kulturmedium alleine sowie Kulturmedium mit Vehikel, wobei bei Versuchen zusätzlich noch PP2 als Referenzsubstanz hinzugezogen wurde.

Im ersten Versuch wurden die Substanzen S7, SI20 und PP2 getestet.

Treatment	Resorption absolut	Resorption %	SEM	N
Control	1,92	111,63	0,65	8
Contr. + Vehikel	1,72	100,00	0,41	8
PP2 10 µM	0,04	2,33	0,01	8
PP2 1 µM	1,79	104,07	0,33	8
PP2 0,1 µM	2,21	123,26	0,61	8
PP2 0,01 µM	1,12	65,12	0,37	8
S7 10 µM	0,58	33,72	0,15	8
S7 1 µM	0,57	33,72	0,12	8
S7 0,1 µM	1,30	75,58	0,19	8
S7 0,01 µM	1,45	84,30	0,32	8
SI20 10 µM	0,05	2,91	0,01	8
SI20 1 µM	0,46	26,74	0,09	8
SI20 0,1 µM	0,87	50,58	0,36	8
SI20 0,01 µM	1,60	93,02	0,48	8

Tabellen 6: Hemmung der Osteoklastenaktivität durch S7 und SI20; Treatment = Substanzzugabe inkl. Konzentrationsangabe, Resorption absolut = Mittelwert der prozentuell resorbierten Fläche pro Plättchen, Resorption % = Resorption prozentuell zu Contr. + Vehikel (= 100%), SEM = Standardabweichung, n = Anzahl der Knochenplättchen

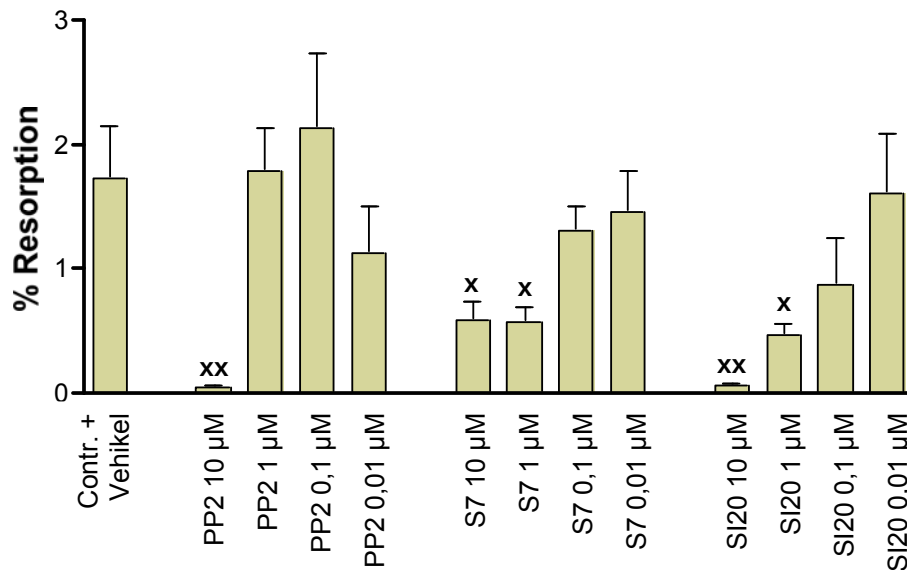


Abbildung 17: Hemmung der Osteoklastenaktivität durch S7 und SI20; xx = sehr signifikante, x = signifikante Hemmung zur Kontrolle mit Vehikel. .

Das Kulturmedium alleine zeigte eine Resorption von 1,92%. S7 zeigt in den Konzentrationen 10 µM und 1 µM ähnlich wie SI20 bei 1 µM im 95%igen Konfidenzintervall einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle mit Vehikel. PP2 und SI20 zeigen bei 10 µM im 99%igen Konfidenzintervall eine signifikanten Unterschied

Bei PP2 ist ein starker Anstieg der Hemmung von 1 µM nach 10 µM zu erkennen. Hier kann von einer steilen Dosis-Wirkungskurve gesprochen werden da die Substanz in den mittleren Konzentrationen minimal hemmt.

S7 zeigt bei 10 µM und 1 µM einen signifikanten Unterschied im 95%igen Konfidenzintervall zur Kontrolle mit Vehikel. Im Mittel kann von einer Hemmung gesprochen werden.

SI20 zeigt in der höchsten Konzentration (10 µM) einen signifikanten Unterschied im 99%igen und in der zweithöchsten Konzentration (1 µM) im 95%igen Konfidenzintervall. SI20 zeigt eine lineare Hemmung.

Im zweiten Versuch wurden ebenfalls die Substanzen S7, SI20 und PP2 im selben Konzentrationsbereich von 10 µM bis 0,01 µM untersucht.

Treatment	Resorption absolut	Resorption %	SEM	N
Control	2,34	64,54	0,37	8
Contr. + Vehikel	3,63	100,00	0,79	8
PP2 10 µM	0,07	1,92	0,01	8
PP2 1 µM	2,83	77,93	0,79	8
PP2 0,1 µM	1,52	41,86	0,37	8
PP2 0,01 µM	1,20	33,04	0,45	8
S7 10 µM	0,36	9,91	0,24	8
S7 1 µM	0,82	22,58	0,23	8
S7 0,1 µM	1,37	37,72	0,71	8
S7 0,01 µM	1,18	32,49	0,46	8
SI20 10 µM	0,95	26,13	0,28	8
SI20 1 µM	0,95	26,13	0,21	8
SI20 0,1 µM	3,09	85,09	0,69	8
SI20 0,01 µM	1,94	53,42	0,62	8

Tabellen 7: Hemmung der Osteoklastenaktivität unter S7 und SI20; Treatment = Substanzzugabe inkl. Konzentrationsangabe, Resorption absolut = Mittelwert der prozentuell resorbierten Fläche pro Plättchen, Resorption % = Resorption prozentuell zu Contr. + Vehikel (= 100%), SEM = Standardabweichung, n = Anzahl der Knochenplättchen

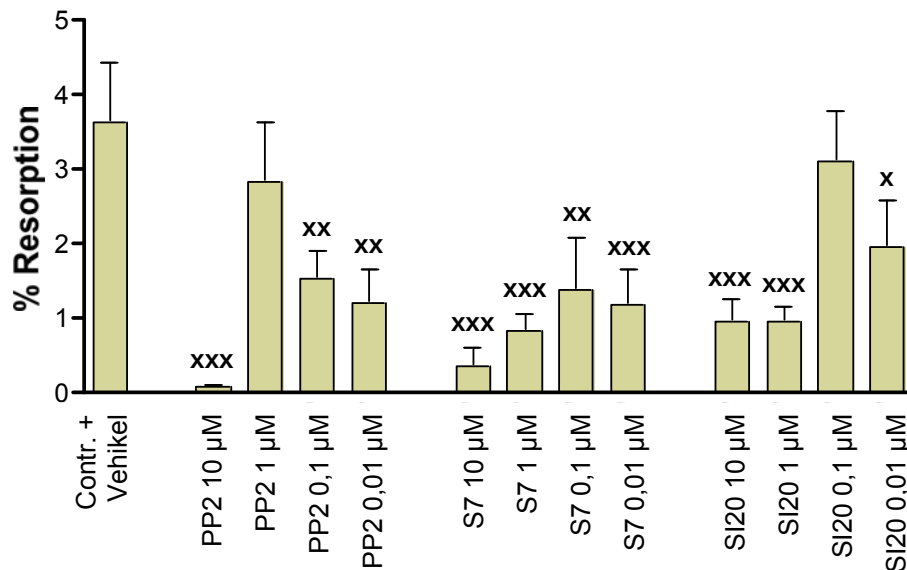


Abbildung 18: Hemmung der Osteoklastenaktivität durch S7 und SI20; xxx = hoch signifikante, xx = sehr signifikante, x = signifikante Hemmung zur Kontrollen mit Vehikel.

Das Kulturmedium alleine zeigt eine Resorption von 2,34; SI20 0,01 µM ist im 95%igen Konfidenzintervall, PP2 0,1 µM und 0,01 µM sowie S7 0,1 µM im 99%igen Konfidenzintervall, PP2 10 µM sowie S7 10 µM, 1 µM und 0,01 µM und sowie SI20 10 µM und 1 µM im 99,9%igen Konfidenzintervall zur Kontrolle mit Vehikel signifikant unterschiedlich.

PP2 zeigt eine minimale Hemmung bei 1 µM, wobei die Hemmung bei 10 µM hoch signifikant und bei 0,1 und 0,01 µM sehr signifikant ist.

S7 hemmt die Resorptionsaktivität der Osteoklasten, wobei die Konzentrationen 10 µM, 1 µM und 0,01 µM hoch signifikant und 0,1 µM sehr signifikant sind.

SI20 zeigt bei 10 µM und 1 µM eine sehr signifikante Hemmung, während bei einer Konzentration von 0,1 µM die Resorptionsaktivität der Osteoklasten nicht signifikant und bei 0,01 µM signifikant gehemmt wird.

Treatment	Resorption absolut	Resorption %	SEM	N
Control	3,77	125,25	0,92	6
Contr. + Vehikel	3,01	100,00	1,11	6
S7 10 μ M	2,37	78,74	0,99	8
S7 1 μ M	2,05	68,11	0,30	8
S7 0,1 μ M	2,29	76,08	0,31	8
S7 0,01 μ M	0,74	24,58	0,25	8
SI20 10 μ M	0,79	26,25	0,32	8
SI20 1 μ M	3,41	113,29	0,78	8
SI20 0,1 μ M	3,31	109,97	1,07	8
SI20 0,01 μ M	6,97	231,56	1,49	8

Tabellen 8: Hemmung der Osteoklastenaktivität durch S7 und SI20; Treatment = Substanzzugabe inkl. Konzentrationsangabe, Resorption absolut = Mittelwert der prozentuell resorbierten Fläche pro Plättchen, Resorption % = Resorption prozentuell zu Contr. + Vehikel (= 100%), SEM = Standardabweichung, n = Anzahl der Knochenplättchen

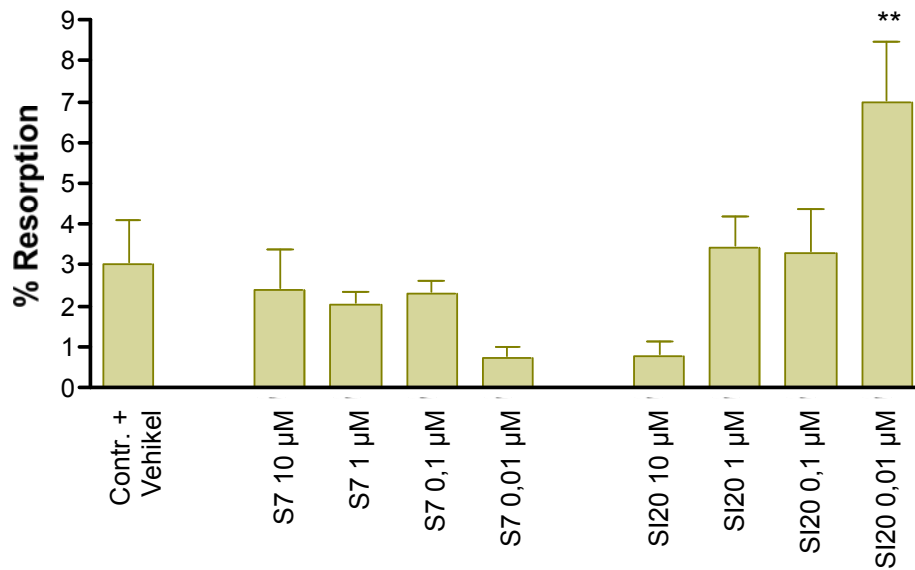


Abbildung 19: Hemmung der Osteoklastenaktivität durch S7 und SI20; xxx = hoch signifikante, xx = sehr signifikante, x = signifikante Hemmung zur Kontrollen mit Vehikel.

Das Kulturmedium alleine zeigte eine Resorption von 3,77%. SI20 zeigte bei 0,01 µM einen signifikanten Unterschied im 99%igen Konfidenzintervall zur Kontrolle mit Vehikel. ($p < 0,001$)

Das Ergebniss von S7 lässt keine klare Aussage zu, liegt aber im Trend.

SI20 zeigt im Mittel eine Hemmung. Die geringste Konzentration von 0,01 µM zeigt zu Kontrolle mit Vehikel eine vermehrte Resorption und ist daher als experimentelles Artefakt zu betrachten. Dies bedeutet aber auch, dass die maximale Resorption in der Kontrollgruppe nicht erreicht wurde.

Zusammenfassung der Wirkungen von PP2, S7 und SI20

PP2 zeigt zwischen den Konzentrationen 10 µM und 1 µM eine sehr steile Dosis-Wirkungskurve und hemmt ab einer Konzentration von 1 µM nicht mehr.

S7 zeigt im Mittel eine konzentrationsabhängige Hemmung, wobei die beiden höheren Konzentrationen (10 μM und 1 μM) einmal signifikant und einmal hoch signifikant hemmten. Die niedrigeren Konzentrationen (0,1 μM und 0,01 μM) zeigten einmal keine und einmal eine sehr bzw. hoch signifikante Hemmung. In einem Versuch (Versuch 1) trat bei keiner Konzentration eine signifikante Hemmung auf.

Bei SI20 findet man bei allen Versuchen im Mittel eine konzentrationsabhängige Hemmung. Die Hemmung ist in 2 Versuchen belegt, bei denen die höchste Konzentration (10 μM) sehr signifikant ($p < 0,01$) und hoch signifikant ($p < 0,001$) unterschiedlich untergegenüber der Kontrolle mit Vehikel ist.

3.3 Austestung der Wirkung der Wirkung von S13 und S31 auf die Resorptionsaktivität von Osteoklasten

Hier wurde in 2 unabhängigen Versuchen der Effekt auf die Resorptionsaktivität von Osteoklasten im Konzentrationsbereich von 10 μM bis 0,01 μM untersucht. Als Referenzen dienten, wie auch schon bei S7 und SI20, einerseits Kulturmedium alleine sowie mit Vehikel andererseits PP2.

Versuch 1

Treatment	Resorption absolut	Resorption %	SEM	N
Control	1,78	119,46	0,66	7
Contr. + Vehikel	1,49	100,00	0,37	8
PP2 10 µM	0,59	39,60	0,24	8
PP2 1 µM	1,68	112,75	0,42	8
PP2 0,1 µM	1,06	71,14	0,38	8
PP2 0,01 µM	0,99	66,44	0,32	8
S13 10 µM	0,43	28,86	0,31	8
S13 1 µM	0,23	15,44	0,07	8
S13 0,1 µM	0,50	33,56	0,11	8
S13 0,01 µM	0,88	59,06	0,21	8
S31 10 µM	0,05	3,36	0,02	8
S31 1 µM	0,34	22,82	0,18	8
S31 0,1 µM	0,42	28,19	0,09	8
S31 0,01 µM	0,69	46,31	0,15	8

Tabellen 9: Hemmung der Osteoklastenaktivität durch S13 und S31; Treatment = Substanzzugabe inkl. Konzentrationsangabe, Resorption absolut = Mittelwert der prozentuell resorbierten Fläche pro Plättchen, Resorption % = Resorption prozentuell zu Contr. + Vehikel (= 100%), SEM = Standardabweichung, n = Anzahl der Knochenplättchen

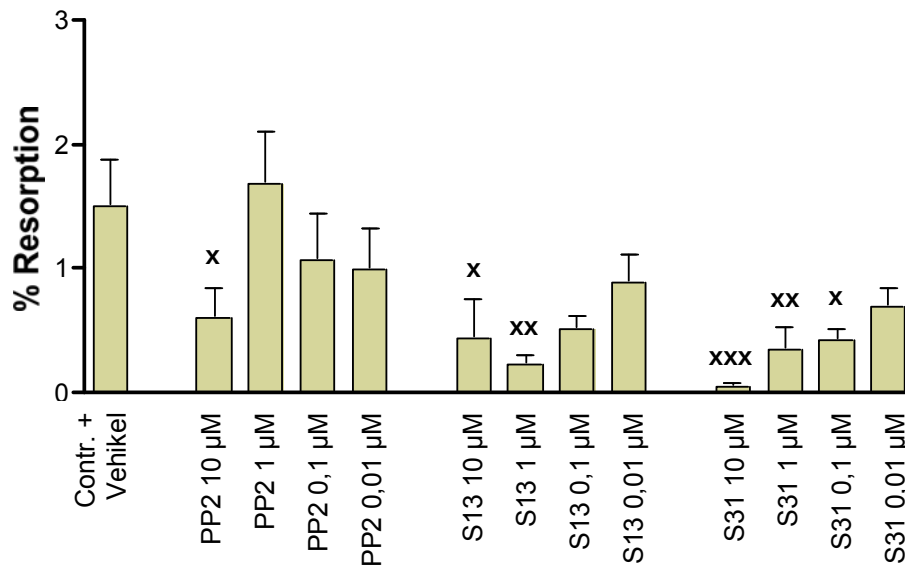


Abbildung 20: Hemmung der Osteoklastenaktivität durch S13 und S31; xxx = hoch signifikante, xx = sehr signifikante, x = signifikante Hemmung zur Kontrollen mit Vehikel.

Das Kulturmedium alleine zeigt eine prozentuelle Resorption von 1,78. PP2 10 µM sowie S13 10 µM und S31 0,1 µM zeigen im 95%igen Konfidenzintervall, S13 1 µM sowie S31 1 µM im 99%igen Konfidenzintervall und S31 10 µM im 99,9%igen Konfidenzintervall einen signifikanten Unterschied.

PP2 zeigt die schon bei den obigen Versuchen beschriebene steile Dosis-Wirkungskurve zwischen den Konzentrationen 10 µM und 1 µM. Die Hemmung bei 10 µM ist signifikant (40%).

Bei S13 zeigt die Hemmung der Resorptionsaktivität der Osteoklasten eine U-förmige Charakteristik, wobei im Mittel eine Hemmung den Konzentrationen entsprechend erkennbar ist. Die Konzentrationen 10 µM weist einen signifikanten (29%) und 1 µM einen sehr signifikanten Unterschied (15%) zur Kontrolle mit Vehikel auf.

S31 zeigt eine fast linear konzentrationsabhängige Hemmung, wobei 10 µM einen hoch (0,03%), 1 µM einen sehr (22%) und 0,1 µM einen signifikanten Unterschied (28%) zur Kontrolle mit Vehikel zeigt.

Beim zweiten Versuch mit den Substanzen PP2, S13 und S31 wurden wieder dieselben Konzentrationsbereiche untersucht.

Treatment	Resorption absolut	Resorption %	SEM	N
Control	2,75	214,84	0,77	8
Contr. + Vehikel	1,28	100,00	0,38	8
PP2 10 µM	0,25	19,53	0,122	8
PP2 1 µM	1,39	108,59	0,35	8
PP2 0,1 µM	1,15	89,84	0,48	8
PP2 0,01 µM	0,83	64,84	0,23	8
S13 10 µM	0,87	67,97	0,37	8
S13 1 µM	0,26	20,31	0,08	8
S13 0,1 µM	0,15	11,72	0,03	8
S13 0,01 µM	0,64	50,00	0,17	8
S31 10 µM	0,18	14,06	0,04	8
S31 1 µM	0,20	15,63	0,04	8
S31 0,1 µM	0,31	24,22	0,14	8
S31 0,01 µM	0,21	16,41	0,04	8

Tabellen 10: Hemmung der Osteoklastenaktivität mit S13 und S31; Treatment = Substanzzugabe inkl. Konzentrationsangabe, Resorption absolut = Mittelwert der prozentuell resorbierten Fläche pro Plättchen, Resorption % = Resorption prozentuell zu Contr. + Vehikel (= 100%), SEM = Standardabweichung, n = Anzahl der Knochenplättchen

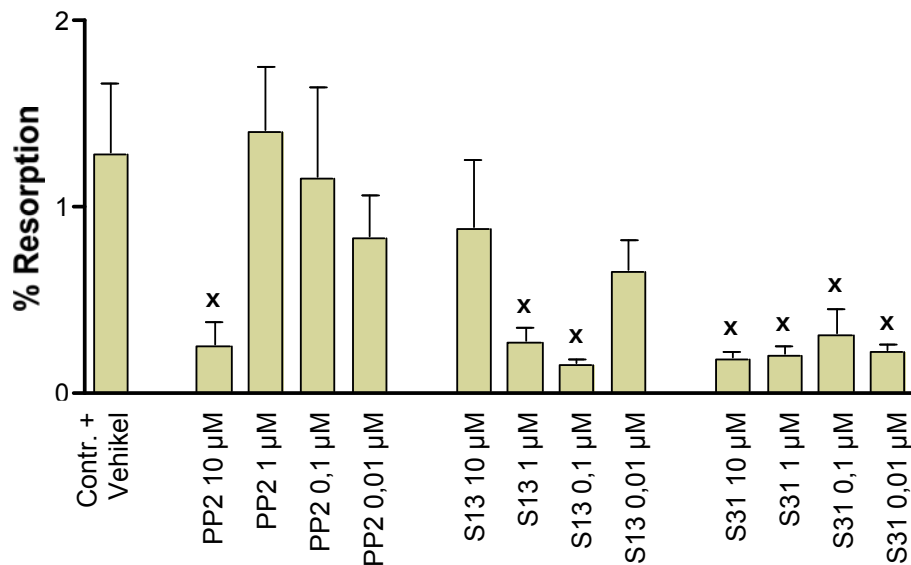


Abbildung 21: Hemmung der Osteoklastenaktivität durch S13 und S31; xxx = hoch signifikante, xx = sehr signifikante, x = signifikante Hemmung zur Kontrollen mit Vehikel

Das Kulturmedium alleine zeigt eine Resorption von 2,75. PP2 10 µM, S13 1 µM und 0,1 µM sowie S31 alle Konzentrationen zeigen im 95%igen Konfidenzintervall einen signifikanten Unterschied.

PP2 zeigt die bereits beschriebene steile Dosis-Wirkungskurve zwischen den Konzentrationen 10 µM und 1 µM. Die Hemmung bei 10 µM ist signifikant (20%).

Die Hemmung von S13 zeigt eine u-förmige Charakteristik, wobei 1 µM und 0,1 µM einen signifikanten Unterschied (20% und 11%) zur Kontrolle mit Vehikel auf weisen.

S31 zeigt eine kontinuierliche Hemmung über alle Konzentrationen hinweg, dementsprechend weisen alle Konzentrationen einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle mit Vehikel auf.

Zusammenfassung der Wirkungen von S13 und S31

PP2 zeigt eindeutig eine steile Dosis-Wirkungskurve, wobei die maximale Hemmung bei 1 μM liegt.

S13 zeigt ein Maximum der Hemmung bei den mittleren Konzentrationen (1 μM und 0,1 μM), dort tritt bei beiden Versuchen eine signifikante bzw. sehr signifikante Hemmung verglichen mit Kontrolle mit Vehikel auf.

S31 zeigt bei allen eingesetzten Konzentrationen eine signifikante tlw. sehr bzw. sogar hoch signifikante Hemmung. Hier sind Versuche mit geringeren Konzentrationen anzuschließen.

3.4 Austestung der Wirkung von S13 und S31 auf die Osteoklastengnese

Hier wurde der Effekt der Substanzen S13 und S31 auf die Osteoklastenbildung mittels TRAP-Färbung analysiert. Wie in Punkt 2.2.4.1 wurde als Kriterium für eine reifen Osteoklasten das Kriterium von mindestens drei Zellkernen gesetzt.

Treatment	Zellen/Well absolut	Zellen/Well %	SEM	N
Control	692,33	104,58	151,40	3
Contr. + Vehikel	662,00	100,00	73,51	3
PP2 10 µM	0,00	0,00	0,00	3
PP2 1 µM	996,33	150,50	127,10	3
PP2 0,1 µM	499,33	75,43	93,16	3
PP2 0,01 µM	771,00	116,47	62,00	3
S13 10 µM	479,00	72,36	18,77	3
S13 1 µM	670,00	101,21	69,90	3
S13 0,1 µM	868,66	131,22	30,02	3
S13 0,01 µM	1028,66	155,39	158,97	3
S31 10 µM	48,00	7,25	5,30	3
S31 1 µM	422,66	63,85	17,11	3
S31 0,1 µM	637,66	96,32	56,32	3
S31 0,01 µM	921,66	139,22	37,77	3

Tabelle 11: Hemmung der Osteoklastenbildung mit S13 und S31; Zellen/Well absolut = gezählte reife Osteoklasten pro Well; Zellen/Well % = gezählte Zellen prozentuell zu Contr. + Vehikel (= 100%), SEM = Standardabweichung; n = Anzahl der Wells pro Substanzkonzentration

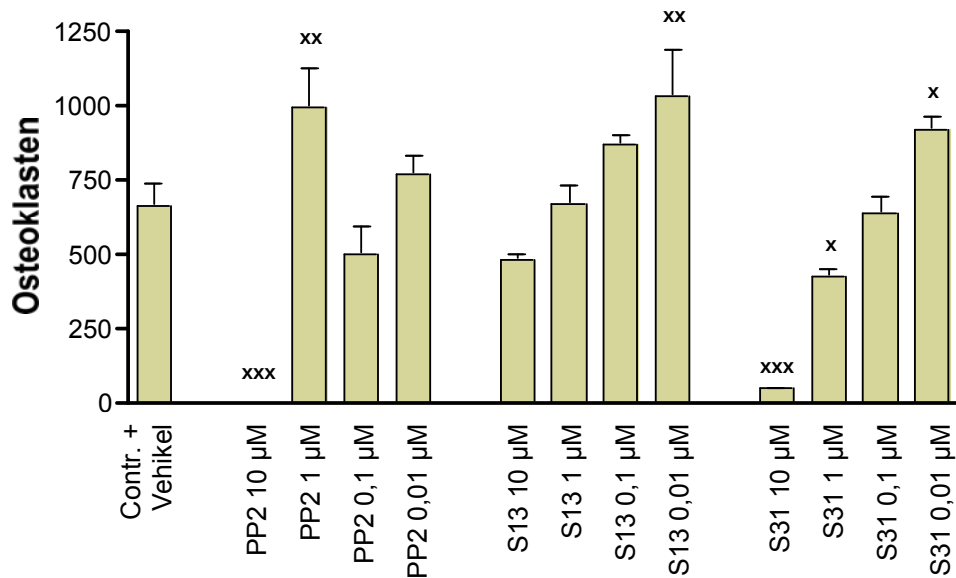


Abbildung 22: Hemmung der Osteoklastenbildung durch S13 und S31; xxx = hoch signifikante, xx = sehr signifikante, x = signifikante Hemmung zur Kontrollen mit Vehikel

Das Kulturmedium alleine zeigt eine Osteoklastenbildung von 692,33 Zellen/Well; S31 1 µM und S31 0,01 µM zeigen im 95%igen Konfidenzintervall, PP2 1 µM und S13 0,01 µM im 99%igen Konfidenzintervall sowie PP2 10 µM S31 10 µM im 99,9%igen Konfidenzintervall signifikante Unterschiede.

PP2 zeigt die erwartete steile Dosis-Wirkungskurve, wobei 1 µM einen sehr signifikanten und 10 µM einen hoch signifikanten Unterschied zur Kontrolle mit Vehikel zeigt. Dass heißt, eine Konzentration von 1 µM forciert die Osteoklastenentstehung.

S 13 zeigt einen linearen Anstieg den Konzentrationen entsprechend, wobei die Konzentration von 0,01 µM einen signifikanten Anstieg gegenüber der Kontrolle mit Vehikel aufweist. Eine geringe Konzentration von S 13 im Ausmaß von 0,01 µM scheint die Osteoklastengenese zu begünstigen, während hingegen Konzentrationen ab 10 µM die Genese hemmen.

S 31 zeigt ebenfalls eine linearen Anstieg den Konzentrationen entsprechend, wobei die Konzentration von 0,01 µM einen signifikanten Anstieg und 1 µM eine signifikante Hemmung, 10 µM eine hoch signifikante Hemmung zeigt.

Davon abgesehen, dass die maximale Osteoklastengenese in der Kontrollgruppe mit Vehikel nicht erreicht wurde, liegen die Ergebnisse im zu erwartenden Bereich.

3.5 Austestung der Wirkung von S13 und S31 auf die Zytoskelettbildung und Apoptoseverhaltens von Osteoklasten

Parallel zur TRAP-Färbung wurde eine Rhodamin-DAPI-Färbung von Osteoklasten durchgeführt, um festzustellen welche Auswirkungen die Testsubstanzen auf die Ausbildung des Aktinrings haben und ob Zellkernfragmentierungen auftreten, d.h. ob sie Apoptose auslösen können.

Die Auswertung erfolgte einerseits als Dokumentation in fotografischer und schriftlicher Form und andererseits als Balkendiagramm, wobei pro Konzentration ein Deckglas ausgewertet wurde. Die Berechnung der Standardabweichung wurde weggelassen.

Treatment	Zellen/Deckglas absolut	Zellen/Deckglas %	SEM	N
Control	100,50	140,89	47,50	2
Contr. + Vehikel	71,33	100,00	15,59	3
PP2 10 μ M	0	0,00		1
PP2 1 μ M	38	53,27		1
PP2 0,1 μ M	78	109,35		1
PP2 0,01 μ M	90	126,17		1
S13 10 μ M	0	0,00		1
S13 1 μ M	11	15,42		1
S13 0,1 μ M	80	112,15		1
S13 0,01 μ M	109	152,81		1
S31 10 μ M	1	1,40		1
S31 1 μ M	20	28,04		1
S31 0,1 μ M	112	157,02		1
S31 0,01 μ M	108	151,41		1

Tabelle 12: Hemmung der Aktinringbildung von Osteoklasten durch S13 und S31; Zellen/Deckglas absolut = gezählte reife Osteoklasten pro Deckglas; Zellen/Deckglas % = gezählte Osteoklasten pro Deckglas prozentuell zu Contr. + Vehikel (= 100%), SEM = Standardabweichung; n = Anzahl der untersuchten Deckgläser

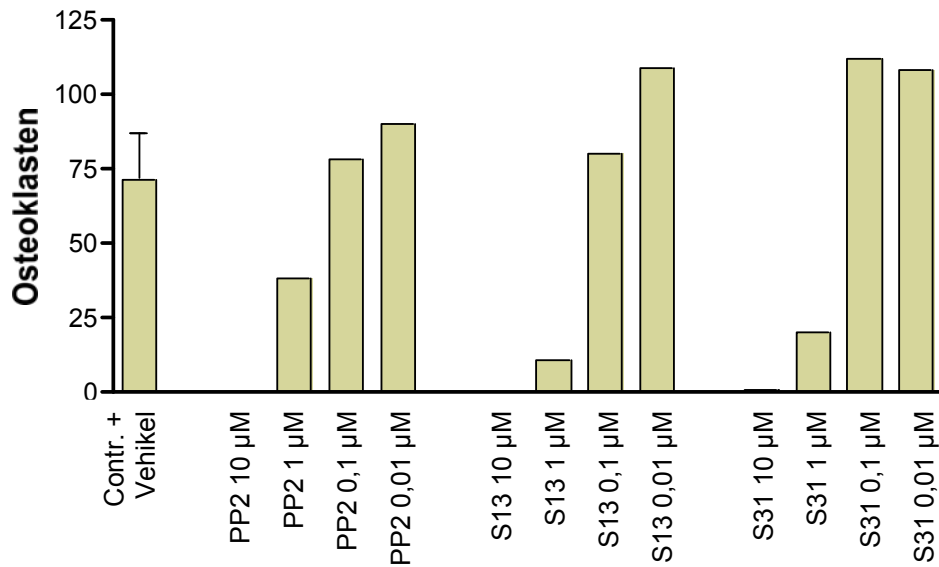


Abbildung 23: Hemmung der Aktinringbildung von Osteoklasten unter S13 und S31; Signifikanzen siehe Text.

Das Kulturmedium alleine zeigt 100,50 Osteoklasten/Deckglas; Signifikanzen wurde aufgrund der geringen Grundgesamtheit nicht angegeben.



Abbildung 24: Ein Osteoklast der Gruppe ohne Behandlung, der Aktinring ist als roter, hellerer Rand gut zu erkennen, die Zellkerne sind blau gefärbt.

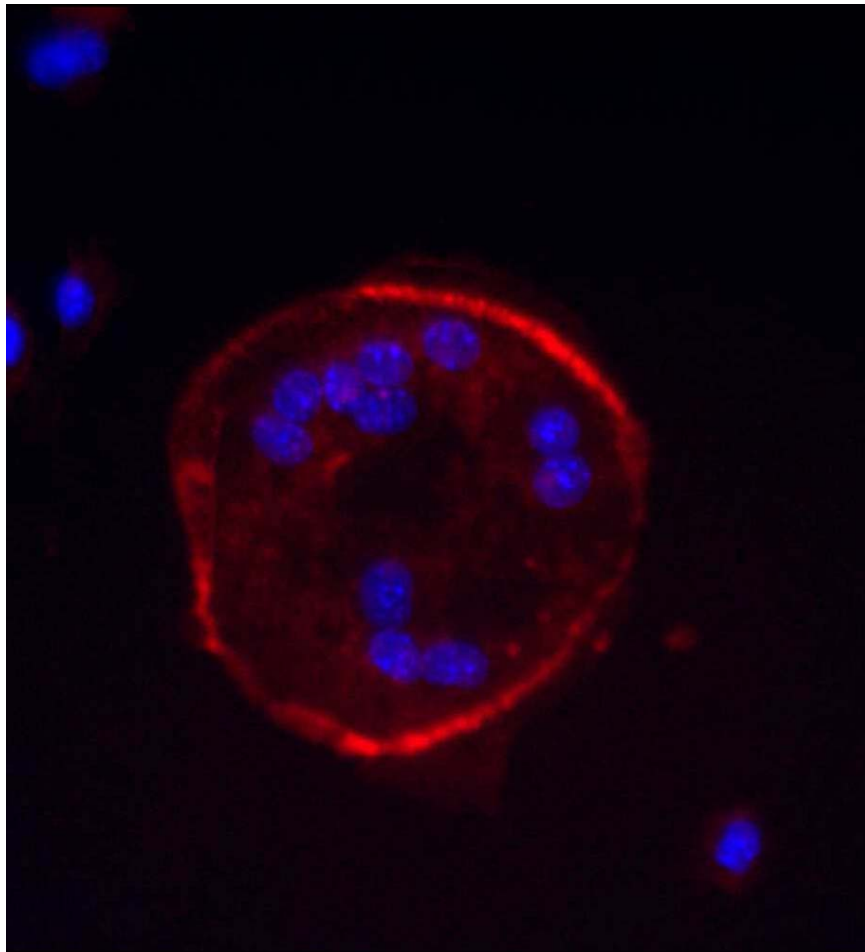


Abbildung 25: Ein Osteoklast der DMSO-Gruppe, der Aktinring erscheint außen als heller roter Ring, die Zellkerne erscheinen blau.

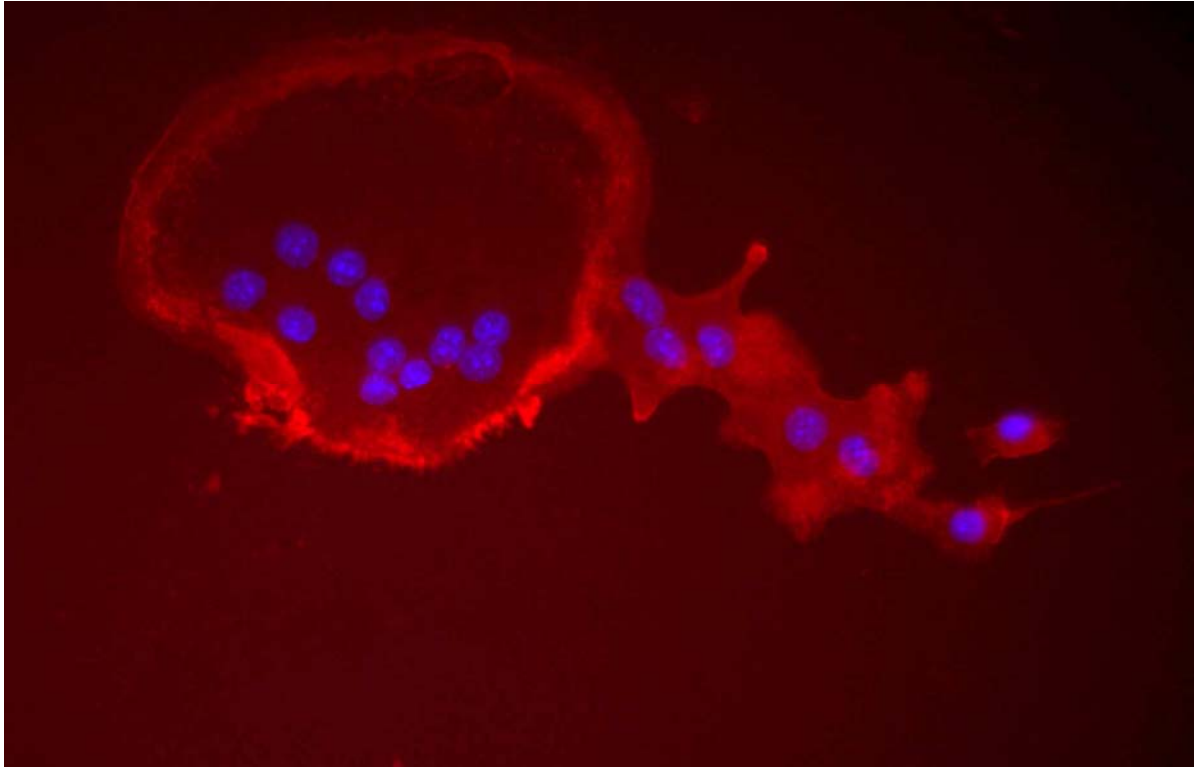


Abbildung 26: Eine Osteoklast der Gruppe: PP2 1 μ M. Der Osteoklast zeigt eine deutliche Ausstülpung, die Zellkerne sind unauffällig.

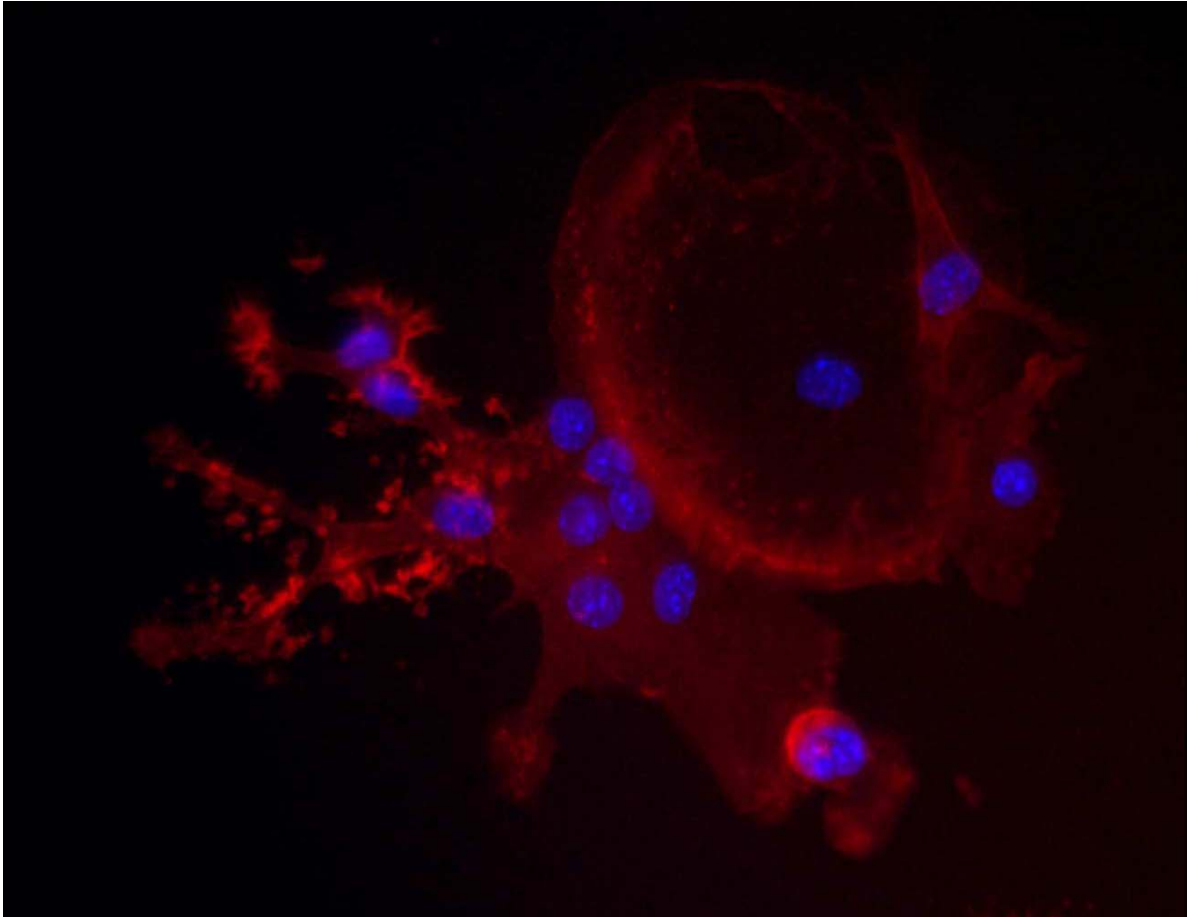


Abbildung 27: Ein Osteoklast der Gruppe PP2 0,01 μM . Der Aktinring ist nur teilweise ausgeprägt und zeigt eine deutliche Missbildung, die Zellkerne sind unauffällig.

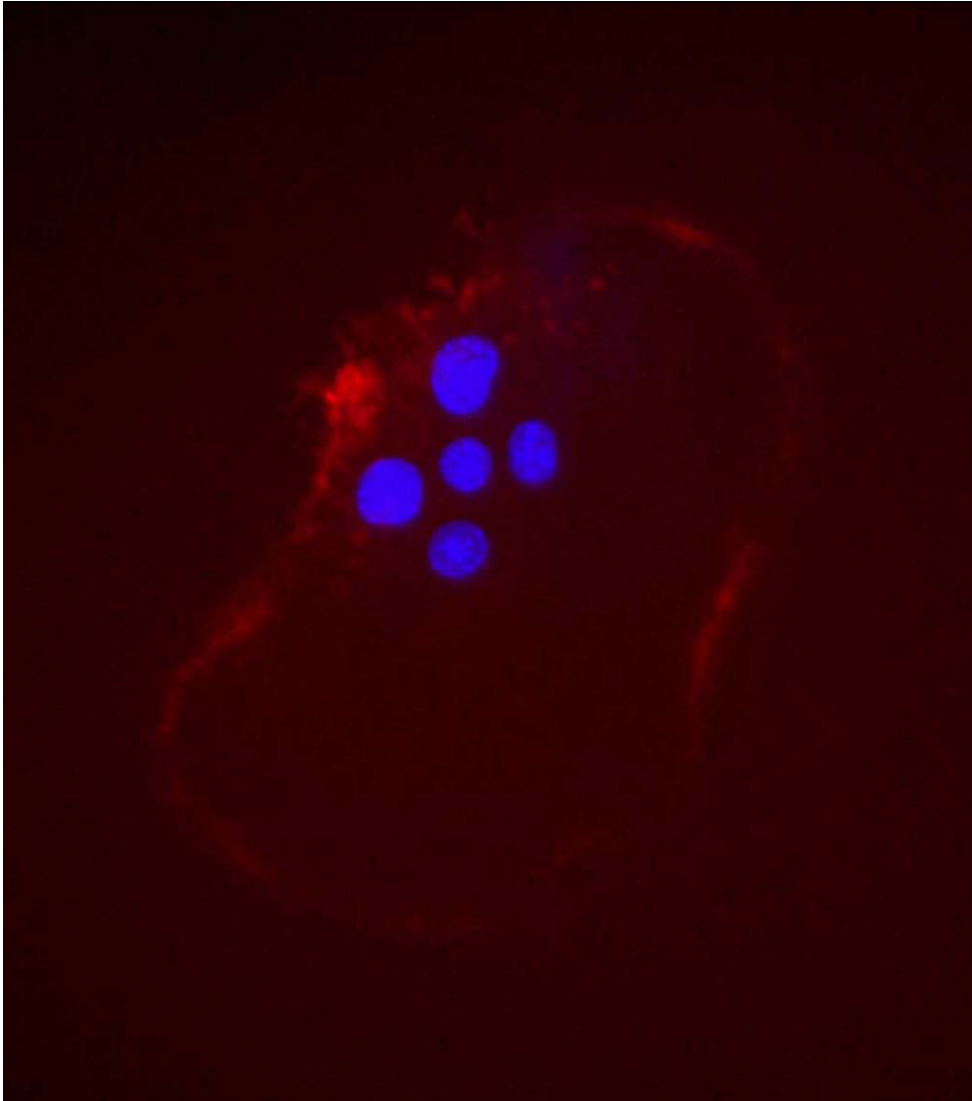


Abbildung 28: Ein Osteoklast der Gruppe S13 1 μ M. Der Aktinring ist kaum ausgeprägt, die Zellkerne sind unauffällig.

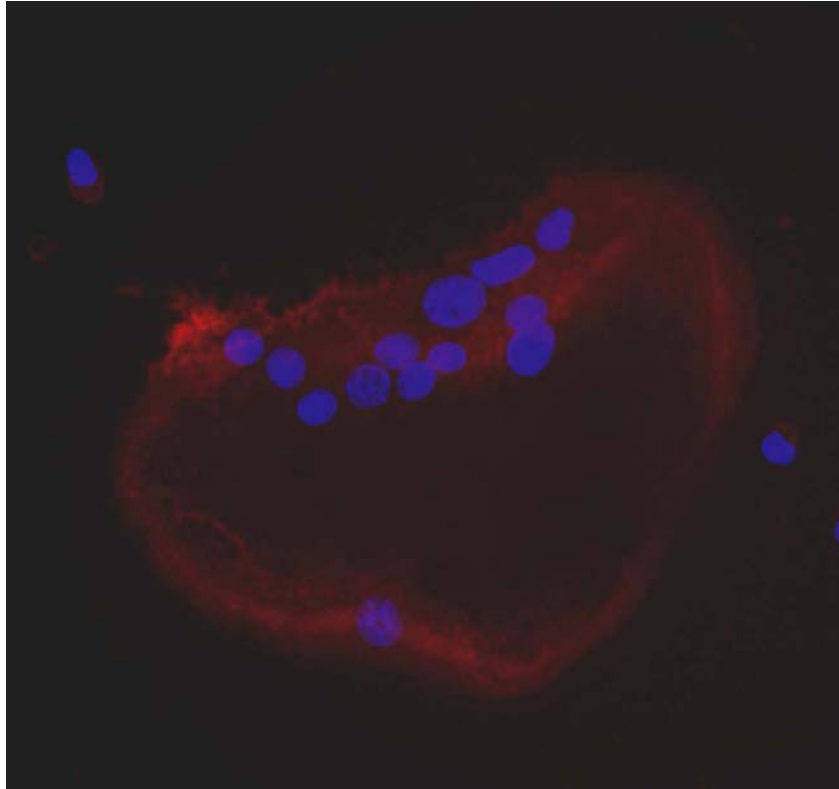


Abbildung 29: Ein Osteoklast der Gruppe S31 0,1 μ M. Der Aktinring ist kaum ausgeprägt, die Zellkerne sind unauffällig.

Die Auswertung in schriftlicher Form brachte folgendes Ergebnis:

Treatment	Aktinring
Control	ausgebildet
Contr. + Vehikel	ausgebildet
PP2 10 μ M	keine kompletten, nur Fragmente
PP2 1 μ M	sehr dünne, wenig
PP2 0,1 μ M	tlw. sehr schöne
PP2 0,01 μ M	ausgebildet
S13 10 μ M	kein Osteoklastenvorkommen
S13 1 μ M	kaum erkennbare Zellen
S13 0,1 μ M	kaum durchgehende
S13 0,01 μ M	tlw. sehr große Osteoklasten
S31 10 μ M	kein Osteoklastenvorkommen
S31 1 μ M	kaum erkennbare Zellen
S31 0,1 μ M	tlw. leicht fragmentiert
S31 0,01 μ M	tlw. große Osteoklasten

Tabelle 13: Auswertung der Hemmung der Zytoskelettbildung von Osteoklasten durch S13 und S31

Augenscheinlich war die Unversehrtheit der Zellkerne. Daraus kann geschlossen werden, dass die Substanzen nicht am Zellkern angreifen und somit keine Apoptose auslösen.

4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden Substanzen vom Pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-typ mit den Kurzbezeichnungen SI83, S7, SI20, S13 und S31 auf ihre Eigenschaft hin untersucht, osteoklastäre Prozesse und Funktionen sowie die Genese von Osteoklasten zu hemmen. Diese Substanzen stellen neue Src-Kinaseinhibitoren dar.

Src ist ein Proto-Onkogen, welches in der Genese und Invasion von vielen Krebsarten beteiligt ist. Diese nicht-rezeptorale-Tyrosin-Kinase spielt auch eine entscheidende Rolle bei der Knochen-Homöostase, da die Inhibierung oder Zerstörung der Src-Kinase die Funktion der Osteoklasten beeinträchtigt. (Rucci et al., 2008)

Zur Untersuchung der Resorptionsaktivität wurden Pitt-Essays verwendet. Hierbei wurde die Hemmung der Resorptionsaktivität durch die Substanzen S7 und SI20 in drei, jene der Substanzen S13 und S31 in zwei Versuchen gezeigt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Substanzen in den Konzentrationsbereichen 10 μM bis 0,01 μM signifikant bis hoch signifikant hemmen.

Aufgrund der Ergebnisse aus diesen Untersuchungen wurden die Substanzen S13 und S31 hinsichtlich der Hemmung der Osteoklastengenese, der Zytoskelettbildung sowie der Einfluss auf das Apoptoseverhalten weiter untersucht. Hierfür wurden Co-Kulturen mit angeschlossener TRAP-Färbung beziehungsweise Rhodamin-DAPI-Färbung verwendet. Dabei konnten die Ergebnisse der vorherigen Versuche tendenziell bestätigt werden.

Es ist also denkbar, dass die Src-Kinase ein geeignetes Ziel für die medikamentöse Behandlung von Krebs, Metastasen und Skeletterkrankungen wie Osteoporose sein kann. (Rucci, et al. 2008)

5 Diskussion

30 Jahre nach ihrer Entdeckung ist die Tyrosin-Kinase noch im Mittelpunkt intensiver Forschung. Als Prototyp für nicht-rezeptorale-Tyrosin-Kinasen spielt Src eine spezifische Rolle in der Knochenbiologie. Src-Kinase-Inhibitoren geben neue Impulse und ein neues Werkzeug auf dem Gebiet der Osteoporose. (Susa und Teti 2000)

Die Gruppe um Missbach untersuchte die Substanz CGP77675, welche ein 5,7-Diphenyl-pyrrolo[2,3-d]-pyrimidin-Grundgerüst hat und somit strukturelle Ähnlichkeit mit den im Rahmen dieser Diplomarbeit untersuchten Substanzen aufweist. Dabei wurde festgestellt, dass die Osteoklasten in ihren Funktionen und Prozessen gehemmt werden, indem die Phosphorylierung von Peptidsubstraten und die Autophosphorylierung von gereinigten Src inhibiert werden. (Missbach et al., 1999)

Auswirkungen auf die Resorptionsaktivität von Osteoklasten

Die Gruppe um Recchia untersuchte die Substanzen CGP77675 und CGP76030, welche beide ein 5,7-Diphenyl-pyrrolo[2,3-d]-pyrimidin-Grundgerüst haben. Dabei wurde festgestellt, dass die Resorptionsaktivität von Osteoklasten bei 1 µM um 75-80% gehemmt wird. (Recchia et al., 2004)

Somit sind diese Substanzen mit SI20 (Verringerung der Resorption bei 1 µM um durchschnittlich 73,5%) sowie mit S13 (82,5%) und S31 (75,5%) in ihrer Hemmstärke vergleichbar. Hingegen hemmt S7 bei 1 µM die osteoklastäre Knochenresorption geringer (58,3%). Bei 10 µM hingegen hemmt S7 die Resorption um durchschnittlich 81,3%, sodass hier von einer um den Faktor 10 geringeren Wirkstärke verglichen mit CGP77675 bzw. CGP76030 ausgegangen werden kann.

Auswirkungen auf die Osteoklastengnese

Recchia et al. zeigten mittels einer TRAP-Färbung weiter, dass die Osteoklastengnese in Anwesenheit einer der beiden Inhibitoren bei 1 μM so gut wie vollständig unterdrückt war. (Recchia, et al. 2004)

Diese Ergebnisse können für die Substanzen S13 und S31 tendenziell bestätigt werden. Bei der höchsten im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Konzentration von 10 μM trat eine Hemmung von 28% bei S13 und 93% bei S31 auf.

Daraus kann geschlossen werden, dass eine vollständige Hemmung durch S13 erst bei einer höheren Konzentration zu erwarten ist bzw. bei S31 mit 10 μM fast erreicht wird.

Auswirkungen auf die Zytoskelettbildung von Osteoklasten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Substanzen S13 und S31 auf die Auswirkungen hinsichtlich der Zytoskelettbildung untersucht. Hierbei zeigte sich eine konzentrationsabhängige Hemmung, die bei S13 und S31 zwischen 1 μM und 0,1 μM die Bildung des Zytoskeletts mehr als 50% der Osteoklasten schädigt.

Die Gruppe um Recchia zeigte, dass CGP77675 und CGP76030 bei einer Konzentration von 2 μM die Bildung des Zytoskeletts bei mehr als 50% der Osteoklasten gestört wurde. (Recchia, et al. 2004)

Dies zeigt, dass S13 und S31 um ca. den Faktor 4 stärker die Zytoskelettbildung unterbinden als CGP77675 und CGP76030.

Auswirkung auf das Apoptoseverhalten von Osteoklasten

Bei der Austestung auf die Zytoskelettbildung wurde auch das Apoptoseverhalten untersucht. Jedoch konnte in keiner Konzentration apoptotisches Verhalten der Osteoklasten festgestellt werden.

Recchia et al. konnten jedoch bei CGP77675 und CGP76030 apoptotisches Verhalten der Osteoklasten feststellen. (Recchia, et al. 2004)

Hieraus kann geschlossen werden, dass 5,7-Diphenyl-pyrrolo[2,3-d]-pyrimidine und deren Derivate Apoptose auslösen, während hingegen Pyrazolo[3,4-d]pyrimidine und deren Derivate dies nicht vermögen.

6 Literaturverzeichnis

- Baron JA, Barrett JA, Karagas MR 1996 The epidemiology of peripheral fractures. *Bone* **18**(3 Suppl):209S-213S.
- Bruzzaniti A, Neff L, Sanjay A, Horne WC, De Camilli P, Baron R 2005 Dynamin forms a Src kinase-sensitive complex with Cbl and regulates podosomes and osteoclast activity. *Mol Biol Cell* **16**(7):3301-13.
- Fizazi K 2007 The role of Src in prostate cancer. *Ann Oncol* **18**(11):1765-73.
- Frost HM 1997 Defining osteopenias and osteoporoses: another view (with insights from a new paradigm). *Bone* **20**(5):385-91.
- kmf-laborchemie.de 2005 Fluorescence Probes Phalloidin.
- medinfo.de 2004 Osteopetrosis.
- Missbach M, Jeschke M, Feyen J, Muller K, Glatt M, Green J, Susa M 1999 A novel inhibitor of the tyrosine kinase Src suppresses phosphorylation of its major cellular substrates and reduces bone resorption in vitro and in rodent models in vivo. *Bone* **24**(5):437-49.
- Miyazaki T 2004 Src kinase activity is essential for osteoclast function. *The Journal of biological chemistry* **279**(17):17660.
- Preisinger E 2007 RANK/RANK-Ligand/OPG: Ein neuer Therapieansatz in der Osteoporosebehandlung. *Journal für Mineralstoffwechsel* 2007 **14**:144-145.
- Recchia I, Rucci N, Funari A, Migliaccio S, Taranta A, Longo M, Kneissel M, Susa M, Fabbro D, Teti A 2004 Reduction of c-Src activity by substituted 5,7-diphenyl-pyrrolo[2,3-d]-pyrimidines induces osteoclast apoptosis in vivo and in vitro. Involvement of ERK1/2 pathway. *Bone* **34**(1):65-79.
- Roche-Lexikon 1999 Das Mononukleäre Phagozytensystem.
- Rucci N, Susa M, Teti A 2008 Inhibition of protein kinase c-Src as a therapeutic approach for cancer and bone metastases. *Anticancer Agents Med Chem* **8**(3):342-9.
- Scott P 1982 Rhodamine 6G.
- Shahrara S, Castro-Rueda HP, Haines GK, Koch AE 2007 Differential expression of the FAK family kinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovial tissues. *Arthritis Res Ther* **9**(5):R112.

- Susa M, Teti A 2000 Tyrosine kinase src inhibitors: potential therapeutic applications. *Drug News Perspect* **13**(3):169-75.
- Teti A, Marchisio PC, Zallone AZ 1991 Clear zone in osteoclast function: role of podosomes in regulation of bone-resorbing activity. *Am J Physiol* **261**(1 Pt 1):C1-7.
- Zaidi M 2007 Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med* **13**(7):791-801.

7 Index der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen		
Abb. 1	Steuerung der Knochenresorption	Seite 8
Abb. 2	Schematische Darstellung der Struktur der Src-Kinase	Seite 9
Abb. 3	Aktivierung von Src	Seite 10
Abb. 4	Integrin Signalwege durch Pyk2 oder FAK	Seite 12
Abb. 5	Zeitschema der verwendeten Co-Kultur	Seite 23
Abb. 6	Eine von 5 Photographien von einem Knochenplättchen	Seite 24
Abb. 7	Fotographierschema eines Knochenplättchens	Seite 25
Abb. 8	Aufnahme eines Eichmillimeters horizontal	Seite 26
Abb. 9	Aufnahme eines Eichmillimeters vertikal	Seite 27
Abb. 10	2 Fotos in 5facher Vergrößerung	Seite 28
Abb. 11	Auswertung von drei Substanzgruppen mit beiden Auswertemethoden	Seite 29
Abb. 12	Knochenplättchen mit ungleichmäßiger Pittverteilung	Seite 31
Abb. 13	Phalloidin, Molekülstruktur	Seite 35
Abb. 14	Rhodamin 6G, Molekülstruktur	Seite 36
Abb. 15	DAPI, Molekülstruktur	Seite 37
Abb. 16	Hemmung der Osteoklastenaktivität durch SI83	Seite 40
Abb. 17	Hemmung der Osteoklastenaktivität durch S7 und SI20	Seite 42
Abb. 18	Hemmung der Osteoklastenaktivität durch S7 und SI20	Seite 44
Abb. 19	Hemmung der Osteoklastenaktivität durch S7 und SI20	Seite 46

Abb. 20	Hemmung der Osteoklastenaktivität durch S13 und S31	Seite 49
Abb. 21	Hemmung der Osteoklastenaktivität durch S13 und S31	Seite 51
Abb. 22	Hemmung der Osteoklastenaktivität durch S13 und S31	Seite 54
Abb. 23	Hemmung der Aktinringbildung von Osteoklasten unter S13 und S31	Seite 57
Abb. 24	Ein Osteoklast der Gruppe ohne Behandlung	Seite 58
Abb. 25	Ein Osteoklast der DMSO-Gruppe	Seite 59
Abb. 26	Ein Osteoklast der Gruppe: PP2 1 μ M	Seite 60
Abb. 27	Ein Osteoklast der Gruppe: PP2 0,01 μ M	Seite 61
Abb. 28	Ein Osteoklast der Gruppe S13 1 μ M	Seite 62
Abb. 29	Ein Osteoklast der Gruppe S31 0,1 μ M	Seite 63

Tabellen		
Tab. 1	Chemische Struktur von SI83, SI20, S7, S13 und S31	Seite 15
Tab. 2	Überblick über die ausgewerteten Flächen der beiden Auswertemethoden	Seite 29
Tab. 3	Zeitvergleich der Auswertemethoden bezogen auf ein Knochenplättchen	Seite 33
Tab. 4	Signifikanzkriterien des Fisher PLSD-Tests	Seite 38
Tab. 5	Hemmung der Osteoklastenaktivität durch SI83	Seite 39
Tab. 6	Hemmung der Osteoklastenaktivität durch S7 und SI20	Seite 41
Tab. 7	Hemmung der Osteoklastenaktivität durch S7 und SI20	Seite 43
Tab. 8	Hemmung der Osteoklastenaktivität durch S7 und SI20	Seite 45
Tab. 9	Hemmung der Osteoklastenaktivität durch S13 und S31	Seite 48
Tab. 10	Hemmung der Osteoklastenaktivität durch S13 und S31	Seite 50
Tab. 11	Hemmung der Osteoklastenaktivität durch S13 und S31	Seite 53
Tab. 12	Hemmung der Aktinringbildung von Osteoklasten durch S13 und S31	Seite 56
Tab. 13	Auswertung der Hemmung der Zytoskelettbildung von Osteoklasten durch S13 und S31	Seite 64

8 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 13. Jänner 1972
Geburtsort: Bruck an der Mur/Stmk
Familienstand: ledig

Schulbildung

1976-1982 Volksschule in Admont/Steiermark
1983-2002 Werksschulheim Felbertal in Ebenau/Salzburg

Hochschulbildung

seit 10/1998 Studium der Pharmazie an der Universität Wien

Wehrersatzdienst

10/2000-9/2001 Ableistung des Zivildienstes in Wien