

Aus der Klinik mit Schwerpunkt
Klinische Immunologie und Rheumatologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**In vitro Untersuchungen zum Einfluss
des selektiven COX-2 Inhibitors Celecoxib
auf humane Osteoblasten**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -
Universitätsmedizin Berlin

von
Steffen Lach
aus Potsdam

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. F. Buttgerit
2. Prof. Dr. med. A. Krause
3. Prof. Dr. med. R. Straub

Datum der Promotion: 26.06.2006

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	5
1.1	Der Knochen - ein dynamisches System und seine pathophysiologischen Veränderungen am Beispiel der Osteoporose.....	5
1.1.1	Die zentrale Bedeutung des OPG/RANK/RANKL-Systems im Knochenstoffwechsel.....	9
1.1.2	Die Arachidonsäurekaskade und ihre Bedeutung im Knochenstoffwechsel.....	11
1.1.3	Humane Osteoblasten und die Osteosarkomzelllinie MG-63 als Modellsysteme.....	15
1.2	Aerobe und anaerobe Energieversorgung der Zelle.....	16
1.2.1	Die Regulation des Glukosestoffwechsels über spezifische Transportproteine.....	17
1.2.2	HIF-1 α als Hypoxiemarker und seine Bedeutung für die Entstehung der Rheumatoiden Arthritis.....	17
1.2.3	Potentielle Inhibitoren der Atmungskette am Beispiel des Entkopplers FCCP.....	18
2.	Fragestellungen.....	20
3.	Materialien und Methoden.....	21
3.1	Allgemeiner Versuchsaufbau.....	21
3.2	Zellkultur.....	22
3.2.1	Geräte, Instrumente und Verbrauchsmaterialien.....	22
3.2.2	Medien, Puffer, Reagenzien und Supplemente.....	23
3.2.3	Applizierte Substanzen und deren Herstellung.....	23
3.2.4	Experimentelle Kulturbedingungen und angewandte Zellkulturtechniken.....	24
3.2.5	Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblau-Ausschlussfärbung.....	28
3.3	Genexpressionsanalyse.....	29
3.3.1	Zellgewinnung für die RNA-Isolation.....	29
3.3.2	RNA-Isolation.....	30
3.3.3	Quantifizierung der RNA-Konzentration und Reinheitsbestimmung.....	30
3.3.4	cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase.....	31
3.3.5	Primerauswahl.....	32
3.3.6	Lightcycler-PCR im SYBR Green Format.....	33
3.4	Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte.....	36
3.5	Proteinquantifizierung mittels ELISA-Technik.....	37
3.6	Messung des Sauerstoffverbrauches mit der Clark-Elektrode.....	38
3.7	Nachweis von HIF-1 α in Westernblottechnik.....	40
3.8	Datenerfassung und statistische Auswertung.....	41

Inhaltsverzeichnis

4.	Ergebnisse.....	43
4.1	Zellkultur.....	43
4.1.1	Kultivierung und Wachstumscharakteristik der MG-63 Osteoblasten.....	43
4.1.2	Kultivierung und Wachstumscharakteristik der primären humanen Osteoblasten.....	44
4.1.3	Nachweis der alkalischen Phosphatase in primären humanen Osteoblasten.....	45
4.2	Zellvitalitätsbestimmung mittels Trypanblau-Ausschlussfärbung.....	46
4.3	Genexpressionen von OPG und GLUT-1.....	48
4.4	OPG-Quantifizierung aus den Zellkulturüberständen der primären humanen Osteoblasten.....	55
4.5	Messungen des Sauerstoffverbrauches der MG-63 Osteoblasten.....	56
4.5.1	Effekte von Celecoxib (SC-58635) auf den Sauerstoffverbrauch der MG-63 Osteoblasten.....	56
4.5.2	Effekte von FCCP und Celecoxib (SC-58635) in Kombination auf den Sauerstoffverbrauch der MG-63 Osteoblasten.....	59
4.6	Westernblot zur Proteindarstellung von HIF-1 α in Relation zu β -Actin.....	60
5.	Diskussion.....	62
5.1	Celecoxibkonzentrationen aus pharmakologischer Perspektive.....	62
5.2	Zellkultur der humanen Osteoblasten und alkalische Phosphatasefärbung.....	63
5.3	Zellvitalität nach Celecoxibapplikation.....	65
5.4	Einfluss von Celecoxib auf die OPG-Expression humaner Osteoblasten.....	67
5.5	Einfluss von Celecoxib auf den Energiemetabolismus humaner Osteoblasten.....	73
5.6	Perspektiven.....	79
6.	Zusammenfassung.....	81
7.	Referenzen.....	83
	Danksagung und Widmung.....	92
	Eidesstattliche Erklärung.....	93
	Lebenslauf.....	94
	Abkürzungsverzeichnis.....	95

Danksagung und Widmung

Meinem wissenschaftlichen Betreuer, Herrn Prof. Dr. med. Frank Buttgereit, möchte ich für die freundliche Vergabe des Themas, die umfangreichen fachlichen Unterstützungen und Ratschläge und für seine immerwährende Erreichbarkeit danken.

Herrn Tilo Dehn und Herrn Dr. med. Olaf Schultz möchte ich für die gewissenhafte Einarbeitung in die Methoden der Zellkultur danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Timo Gaber und Herrn Rene Dziurla für die mühevollen Hilfsbereitschaft und den aufopfernden Beistand bei der Etablierung der molekularbiologischen Methoden. Die vielen konstruktiven Diskussionen mit ihnen haben dieser Arbeit maßgeblichen Charakter verliehen.

Für die große Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Sauerstoffverbrauchsmessungen möchte ich Herrn Dr. rer. med. Robert Tripmacher meinen herzlichen Dank aussprechen.

Frau Lorena Martinez-Gamboa danke ich für die vielseitigen fachlichen Gespräche und Erklärungen.

Bei der statistischen Beratung haben mir Frau Dörte Huscher und Herr Martin Rolfs sehr geholfen. Hiermit bedanke ich mich für ihre großartige Unterstützung.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für alle formalen Mitwirkungen an dieser Arbeit sowie ihren allseits liebevollen Bemühungen und Hilfen bedanken.

Diese Dissertation ist meiner lieben Jule gewidmet.

Ihr in mich gesetztes Vertrauen und ihr beständiger Rückhalt haben mir unermesslich Kraft und Motivation gegeben.

Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	-	Abbildung
ANOVA	-	ANalysis Of VAriance
AP	-	Alkalische Phosphatase
APS	-	AmmoniumPerSulphat
AsAP	-	L-Ascorbic Acid-2-Phosphate
ATTC	-	American Type Culture Collection
BCIP	-	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
bFGF	-	basic Fibroblast Growth Factor
BMP	-	Bone Morphogenetic Protein
bp	-	basepairs
BSA	-	Bovine Serum Albumin
cAMP	-	3', 5'-cyclo-AMP
cDNA	-	copy DesoxyriboNucleicAcid
CCCP	-	m-ChlorCabonyl-CyanidPhenylhydrazon
COX	-	CycloOXygenase
cp	-	crossing point
Cys ⁴⁰⁰	-	Transkriptionsfaktor
D	-	Deutschland
DAPI	-	4', 6-diamidino-2-phenylindole
DHA	-	decosahexaenoic acid
DMSO	-	DiMethylSulfOxid
DNA	-	DesoxyriboNucleicAcid
DNP	-	DiNitroPhenol
dNTP	-	2'-desoxyriboNucleosid-5-TriPhosphat
ECL	-	ElectroChemoLuminiszenz
ECO-I	-	Restriktionsenzym-I
EDTA	-	EthylenDiaminTetraAcetat
ELISA	-	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
EPO	-	Erythropoietin
ERK	-	Extracellular-signal Regulated Kinase
Fas	-	Transkriptionsfaktor
FCCP	-	Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone
FCS	-	Fetal Calv Serum
FDCR-1	-	Follicular Dendritic Cell-derived Receptor-1
FGF	-	Fibroblast Growth Factor
g	-	Gramm
GLUT-1	-	Glukosetransporter 1
GM-CSF	-	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
HIF-1 α	-	Hypoxia Inducible Factor 1 α
HK	-	Hexokinase

Abkürzungsverzeichnis

HMIT	-	H ⁺ -coupled Myo-Inositol Transporter
HREs	-	Hypoxia Responsive Elements
HRP	-	Horse Raddish Peroxidase
i.E.	-	internationale Einheiten
IGF	-	Insulin Growth Factor
IL-1	-	Interleukin 1
JNK	-	c-Jun N-terminal Kinase
kbp	-	kilo basepairs
kDA	-	kilo Dalton
KHK	-	Koronare Herzkrankheit
LDH	-	Lactate DeHydrogenase
M	-	molare Masse
MAPK	-	Mitogen Activated Protein Kinase
M-CSF	-	Macrophage-Colony Stimulating Factor
MEM	-	Minimum Essential Medium
ml	-	Milliliter
μl	-	Mikroliter
mRNA	-	messenger RiboNucleicAcid
NBT	-	NitroBlauTetrazoliumchlorid
NEAS	-	Nicht Essentielle Aminosäuren
NFAT	-	Nuclear Factor of Activated T cells
NFκB	-	Nuclear Factor kappa B
nm	-	Nanometer
NO	-	Stickstoffmonoxid
NSAIDs	-	Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs
OCIF	-	OsteoClastogenesis Inhibitory Factor
OD	-	Optische Dichte
OPG	-	OsteoProteGerin
PBS	-	Phosphate Buffers Saline
PCR	-	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PDGF	-	Platelet Derived Growth Factor
PFKL	-	PhosphoFruktoKinase L
pg	-	pikogramm
PGs	-	ProstaGlandins
phOB	-	primäre humane Osteoblasten
pmol	-	pikomol
PVDF	-	PolyVinyliDenFluorid
RA	-	Rheumatoide Arthritis
RANKL	-	Receptor Activator of NFκB Ligand
rpm	-	rotations per minute
s	-	Sekunden

Abkürzungsverzeichnis

SDS	-	Sodium Dodecyl Sulphate
SOC	-	Nährmedium für E.coli
Tab.	-	Tabelle
TAE	-	Tris Acid EDTA
TBS	-	Tris Buffered Saline
TE	-	Tris/EDTA
TEMED	-	N,N,N',N'-TEtraMethylEthyleneDiamine
TGF	-	Transforming Growth Factor
TMB	-	TetraMethylBenzidin
TNF- α	-	Tumor Necrosis Factor α
TOPO-TA	-	Vektorbezeichnung
TR-1	-	TNF Receptor-related molecule-1
TRAIL	-	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand receptors
TRANCE	-	TNF- Related Activation-iNduced Cytokine
TRAP	-	Tartrate Resistant Acid Phosphatase
VEGF	-	Vascular Endothel Growth Factor
Well	-	Vertiefung oder Loch auf einer Kulturplatte (6, 24 oder 96)