

1. Einleitung

1.1 Der Knochen - ein dynamisches System und seine pathophysiologischen Veränderungen am Beispiel der Osteoporose

Der Knochen erfüllt multiple Funktionen im menschlichen Organismus. Zum einen hat er als hochdifferenziertes Gewebe eine Stütz- und Haltefunktion und ist somit unmittelbar in das System des gesamten Bewegungsapparates integriert. Darüber hinaus dient er als Speicherort für Calcium- und Phosphationen und reguliert, zusammen mit den Nieren, die Bilanzierung dieser Elektrolyte. Im Inneren der Knochenhartschicht ist das Knochenmark eingeschlossen, das während des gesamten Lebens für die Hämatopoese verantwortlich ist. Zwischen diesen beiden Systemen besteht eine enge funktionelle Beziehung.

Der Knochen besteht zu 65 % aus Hydroxyapatitkristallen und zu etwa 35 % aus einer organischen Matrix. Diese Matrix ist wiederum zu 90 % aus Kollagen Typ I aufgebaut und besteht zu etwa 10 % aus nicht-kollagenen Proteinen wie Proteoglykanen und Glykoproteinen **(1)**.

Der geordnete Abbau von Knochen und der daran eng gekoppelte Aufbau sind für die normale Entwicklung, die biomechanischen Anpassungsmöglichkeiten und die ständige Erneuerung des Skelettsystems unter Einhaltung der anatomischen und strukturellen Integrität von entscheidender Bedeutung. Diese Funktionen werden durch hochspezialisierte Knochenzellen, den Osteoklasten, Osteoblasten und intraossären Osteozyten realisiert. Die Osteoklasten sind für die Knochenresorption, die Osteoblasten und intraossären Osteozyten für den Knochenaufbau verantwortlich. Unter physiologischen Bedingungen unterliegt der Knochenumbau streng regulierten Zyklen. Initial binden Osteoklasten an die Knochenoberfläche und bauen den Knochen durch Ansäuerung und Proteolyse ab. Wenn die Osteoklasten den Resorptionsort verlassen haben, wandern Osteoblasten ein. Sie beginnen durch die Synthese von Osteoid (Matrix aus Kollagenen und anderen Proteinen), welches später mineralisiert, neuen Knochen zu bilden. Eine Gruppe von Osteoblasten und Osteoklasten bilden dabei eine so genannte „bone remodelling unit“ (Knochenumbaeinheit) **(2)**.

Der Osteoklast ist eine mehrkernige Riesenzelle, die von der Granulozyten-Makrophagen-Linie abstammt **(3)**. Er entsteht durch asynchrone Fusion mononukleärer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark und befindet sich in den so genannten Howship-Resorptionslakunen **(4)**. Charakterisiert wird er vorrangig durch die Expression von Calcitoninrezeptoren, tartratresistente saure Phosphatase (TRAP) sowie vom Vitronectinrezeptor ($\alpha v \beta 3$). Sein apikaler, dem Knochen zugewandter Pol zeigt eine intensivere Anfärbung in der Peripherie („sealing-zone“) und eine hellere, streifige und vakuolisierte zentrale Zone mit extrem gefalteter Zellmembran („ruffled-border“). Im Bereich des „ruffled-border“ fusionieren Vesikel mit lysosomalen Enzymen der Zellmembran. Dadurch können die Enzyme in ein so genanntes Resorptionskompartiment freigesetzt werden. Zudem schafft der Osteoklast durch vakuoläre Protonenpumpen im „ruffled-border“ ein saures Milieu, wodurch sich die Hydroxyapatitkristalle aus der kollagenen Knochenmatrix herauslösen und die Kollagenfasern abgebaut werden können **(5)**.

Osteoblasten stammen ebenfalls von pluripotenten mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks ab. Es gibt eine Vorläuferzellpopulation, die so genannten Präosteoblasten, die bereits teilweise

Einleitung

differenziert sind und sich im weiteren Verlauf zu Osteoblasten mit entsprechender Morphologie und biosynthetischer Aktivität ausdifferenzieren können. Zunächst entwickeln sie sich zu aktiven Osteoblasten mit kubischer Zellform und schließlich in terminal ruhende Osteoblasten, die morphologisch abgeflacht sind **(6-9)**. Inaktive, ruhende Osteoblasten liegen auf den trabekulären Oberflächen des Knochens als „lining cells“. Sie sind in der Lage auf hormonelle Signale zu reagieren, indem sie Botenstoffe freisetzen, die dann die Differenzierung und Aktivität der Osteoklasten beeinflussen. Die ruhenden Osteoblasten nehmen im Vergleich zu den aktiven Osteoblasten das Zehn- bis Hundertfache der endostalen Knochenoberfläche ein und können sich jederzeit in diese umwandeln. Zahlreiche interzelluläre Verbindungen („gap junctions“) existieren zwischen diesen Zellen **(10)**. Die Hauptaufgabe der Osteoblasten ist die Knochenmatrixbildung. Osteoblasten, welche während der Knochenbildung in Lakunen der mineralisierenden Matrix eingeschlossen werden, bezeichnet man als Osteozyten. Ihre charakteristischen Ausläufer liegen in kleinen Kanälen der Knochenmatrix und dienen der Kommunikation mit Knochenmarkzellen sowie den knochenbildenden Osteoblasten an der Oberfläche des Knochens **(11)**. Über diese Matrixkanälchen werden Mineralien und Mediatoren, wie Zytokine und Hormone, während des Knochenumbaus ausgetauscht. Das Hauptprodukt der Osteoblasten ist das bereits erwähnte Kollagen I, welches 90% der organischen Knochenmatrix ausmacht. Weitere wichtige Proteine, die unter anderem auch als Markerproteine genutzt werden, sind alkalische Phosphatase, Osteocalcin, Osteonectin, Bone-Sialoprotein, Fibronectin, Vitronectin, Thrombospondin und Glykosaminoglykane **(12, 13)**. Osteoblasten besitzen Rezeptoren für Prostaglandine, Parathormon, Vitamin D, Glucocorticoide, Sexualhormone, Wachstumshormone, PDGF, VEGF und Schilddrüsenhormone. Ferner produzieren sie zahlreiche Wachstumsfaktoren und Zytokine wie TNF- α , IL-1, IL-6, TGF- β , IGF I und II, OPG und RANKL, die vor allem für die Interaktion von Osteoklasten und Osteoblasten und die Homöostase des Knochenstoffwechsels von entscheidender Bedeutung sind **(14-17)**.

Aus diesen Erläuterungen geht hervor, dass der Knochen einem ständigen Umbauprozess unterliegt. Dieses „Remodelling“ dient der Reparatur von Mikrofrakturen, der Adaptation auf unterschiedlich einwirkende biomechanische Kräfte sowie einer regelrechten Aufrechterhaltung der Calcium- und Phosphathomöostase. In einer BRU („bone remodelling unit“) stehen die Prozesse der osteoklastären Knochenresorption und der osteoblastären Knochenneubildung in enger Beziehung zueinander. Die sich dabei vollziehende gleichwertige Stimulation beider Prozesse wird als „coupling“ bezeichnet, welches sowohl die Balance zwischen Resorptions- und Formationszone als auch die zeitliche Kinetik beschreibt. Für diese komplexe Regulation sind eine Vielzahl lokaler Faktoren notwendig, die andere Organe, wie Niere, Darm oder das endokrine System, mit einbeziehen.

Die Apoptose, der programmierte Zelltod, limitiert schließlich die Funktionen und Lebensdauer beider Zellarten **(18, 19)**. Zytokine wie TNF, die sich in der Mikroumgebung des Knochens befinden, wirken apoptotisch auf Osteoblasten. Dagegen verhindern IL-6 und TGF- β die Apoptose der ruhenden Osteoblasten und Osteozyten **(20)**. Zu den systemischen Regulationsfaktoren des Knochenstoffwechsels gehören das Parathormon, Vitamin D, die Sexualhormone, Calcitonin, die Schilddrüsenhormone, aber auch diverse Zytokine und Wachstumsfaktoren. Parathormon (PTH) ist der wichtigste Regulator der Kalziumhomöostase. Es stimuliert neben der Knochenresorption auch die renale Vitamin D-Produktion und erhöht die tubuläre Kalziumresorption. Bei gepulster Applikation wird

der Knochenaufbau angeregt. Dauerhaft höhere Konzentrationen von PTH können dagegen die Kollagenproduktion hemmen.

Vitamin D, auch als 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bezeichnet, hat sowohl anabole als auch katabole Wirkungen auf den Knochen. Es ist bekannt, dass es bei einem Vitamin-D-Mangel zu einer dramatischen Verschlechterung der Knochenbildung und -mineralisation kommt. Über die Bindung an Rezeptoren der Osteoblasten bewirkt Vitamin D eine Aktivierung der Zellen mit einer erhöhten Expression von alkalischer Phosphatase oder Osteocalcin. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ stimuliert außerdem die Fusion und Differenzierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen. Die Vitamin-D-induzierte Aktivierung von Osteoklasten erfordert, wie auch bei PTH, die Präsenz von Osteoblasten **(21)**.

Östrogene beeinflussen in beiden Geschlechtern die Skelettentwicklung. In der späten Pubertät hemmen sie den Knochenabbau, reduzieren dadurch den Knochenumbau und regulieren den zeitgerechten Schluss der Epiphysenfugen **(22)**. Bei erwachsenen Frauen fördern Östrogene unter anderem die Calcitoninfreisetzung aus der Schilddrüse. Ihre Reduktion während der Menopause führt zu einem Abfall des Serumcalcitonins, wodurch die hemmende Wirkung auf die Knochenresorption abnimmt **(23)**. Östrogene und Parathormon weisen zudem einen indirekten Einfluss auf den Knochenabbau auf. Sie hemmen die Produktion von IL-6, welches stimulierend auf die Entwicklung und Differenzierung der Osteoklastenprogenitoren wirkt **(24)**.

Die physiologische Rolle des Calcitonins scheint gering zu sein, jedoch hemmt es in pharmakologischer Dosierung die Osteoklastenaktivität **(25)**.

Die Schilddrüsenhormone stimulieren sowohl den Knochenabbau als auch den Aufbau des Knochens. Beim Hyperthyreoidismus wird ein erhöhter Knochenumbau beobachtet, der zum Knochenmassenverlust führen kann.

Des Weiteren spielen zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktoren in einem parakrinen und autokrinen Netzwerk zusammen, wobei IL-1, TNF- α , IL-6 und IL-11 sowie GM-CSF und M-CSF eine große Bedeutung für die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten haben. Diese Mediatoren werden unter anderem von Osteoblasten gebildet und wirken über die Vermittlung dieser Zellen auf Osteoklasten. Es konnten bereits Rezeptoren für IL-6 auf Osteoklasten nachgewiesen werden **(26)**. Die Wirkung erfolgt dabei über das Glykoprotein 130 **(27)**. IL-6 wird als Antwort auf zahlreiche lokale und systemische Faktoren von Osteoblasten in erheblichen Mengen produziert. Es stimuliert die Osteoklastogenese und Knochenresorption **(28, 29)**. TNF- α , ein zentrales Zytokin in der Pathogenese der Osteoporose, vermittelt über NF κ B eine verstärkte Expression von IL-6 in Osteoblasten **(30)**. Gleichzeitig hemmt TNF- α die Wirkung von Vitamin D **(31)**. Auch wurde für M-CSF und IL-1 eine direkte Beeinflussung von Osteoblasten nachgewiesen **(32)**. IL-1 und TNF- α kommen besonders in entzündlichen Erkrankungen, wie der RA oder Peridontitis, eine zentrale Bedeutung zu. Solche Erkrankungen sind häufig mit einer Osteoporose assoziiert. *In vivo* Studien im Tiermodell haben gezeigt, dass die Blockierung von TNF- α und IL-1 über lösliche TNF- α -Rezeptoren sowohl zu einer Hemmung der Entzündungsreaktion als auch zu einer Reduktion des Knochenmasseverlustes führen können **(33)**.

Ferner existieren eine Vielzahl anderer Faktoren, wie Prostaglandine, Leukotriene und Stickstoffmonoxid, die für eine schnelle zelluläre Antwort der Knochenzellen auf Entzündung oder mechanischen Reiz verantwortlich sind. Stickstoffmonoxid wird von Osteoblasten produziert und

hemmt direkt deren Aktivität. Niedrige konstitutive Konzentrationen von NO fördern die Osteoblastenproliferation und modulieren die Osteoblastenfunktionen. Höhere Konzentrationen dagegen wirken hemmend auf Osteoblasten (34). Ebenso werden Leukotriene über den Weg der Arachidonsäure synthetisiert. Es konnte gezeigt werden, dass diese auch durch eine stimulierende Wirkung auf die Osteoklastenformation charakterisiert sind (35). Prostaglandine, welche in großen Mengen im Knochen vorliegen, können als potente Regulatoren der Knochenzellfunktionen die Osteoklastenformation steigern. In diesem Zusammenhang spielen die COX-Enzyme eine bedeutende Rolle in der Knochenresorption (36). Deren Bedeutung für die Knochenzellbiologie wird im nachfolgenden Kapitel 1.1.2 abgehandelt.

Aus den dargestellten Zusammenhängen ist ersichtlich, dass sowohl Zytokine als auch Wachstumsfaktoren und systemische Mediatoren bezüglich des Knochenauf- und -abbaus synergistische, überlappende und oft auch gegensätzliche Effekte verursachen. Das komplexe Zusammenwirken dieser Faktoren gewährleistet unter physiologischen Bedingungen eine Homöostase des Knochenstoffwechsels.

Bei der Osteoporose kommt es zu einer chronischen Störung der Calcium- und Phosphathomöostase und damit zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes von Knochenneubildung und Knochenabbau. Dabei ergeben sich durch die veränderte lokale Einwirkung einer großen Anzahl von Gewebsmediatoren, Wachstumsfaktoren und Zytokinen Störungen in der räumlichen und zeitlichen Koordination der Knochenumbauprozesse. Es kommt zu einer negativen Knochenbilanz, welche konsekutiv zu einer erhöhten Knochenbrüchigkeit führt. Klinisch manifestiert sich die Osteoporose durch Frakturen und chronische Schmerzen im Bewegungsapparat. Der häufigste Frakturtyp ist dabei die proximale Femurfraktur, welche erheblich zur Morbidität, Mortalität und erhöhten Kosten im Gesundheitswesen beiträgt. Aber auch Wirbelkörperfrakturen und distale Radiusbrüche sind häufig und verursachen Schmerzen, Deformierungen und Invalidität der Betroffenen. Die Osteoporose lässt sich in Formen mit unbekannter (primäre Osteoporose) und bekannter Ätiologie (sekundäre Osteoporose) einteilen. Zu den primären Osteoporosen zählen die postmenopausale und die senile Osteoporose, für die eine Reihe von Risikofaktoren bekannt sind. Zu diesen gehören:

1. genetische Faktoren (positive Familienanamnese, kaukasische oder asiatische Rasse, weibliches Geschlecht),
2. hormonelle Faktoren (Östrogenmangel, Nullipara),
3. ernährungsbedingte Faktoren (calciumarme und faserreiche Kost, hohe Phosphat- und Proteinzufuhr),
4. verschiedene exogene Faktoren (Bewegungsmangel, geringe UV-Exposition).

Die eigentlichen Ursachen der Erkrankung sind bisher jedoch noch ungeklärt.

Sekundäre Osteoporosen sind häufig auf endokrine Störungen, wie die Hyperthyreose, das Cushing Syndrom oder einen Hyperparathyreoidismus, zurückzuführen. Daneben können Patienten durch medikamentöse Behandlungen mit Immunsuppressiva (z.B. Glukokortikoide), Heparin oder Laxantien eine sekundäre Osteoporose entwickeln. Ferner entstehen Osteoporosen auf dem Boden von Autoimmunerkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis (RA), einer chronisch entzündlichen

Erkrankung von Gelenken und synovialen Strukturen. Schließlich bewirken auch Immobilisation oder renale und intestinale Störungen die Entstehung einer Osteoporose.

Therapeutisch verabreichte Glukokortikoide stellen die häufigste Ursache der sekundären Osteoporosen dar. Die Inzidenz der Glukokortikoid-induzierten Osteoporose ist jedoch nur schwer abschätzbar. Man geht davon aus, dass etwa 30 % der Patienten mit einer Langzeit-Glukokortikoidtherapie Wirbelkörperfrakturen erleiden. Das Risiko einer Schenkelhalsfraktur ist dabei um 50 % erhöht. Jedoch gibt es aufgrund der verschiedenen immunsuppressiven Therapien, der unterschiedlichen Glukokortikoiddosierungen und den vielfältig zugrunde liegenden Erkrankungen nur wenige prospektive Studien. Einige Kurzzeitstudien deuten darauf hin, dass Dauer und kumulative Dosis der Glukokortikoidtherapie mit dem Ausmaß der Osteoporose korrelieren. Zusätzlich wird die Erkrankung auch durch die traditionellen Risikofaktoren einer Osteoporose beeinflusst. Dabei ist die Glukokortikoid-induzierte Osteoporose bei Patienten, die jünger als 15 oder älter als 50 Jahre sind, stärker ausgeprägt.

Die große Bedeutung der Osteoporose begründet sich vor allem in den gravierenden Folgen für die Betroffenen und in den erheblichen Kosten für das Gesundheitssystem. Die Osteoporose betrifft insgesamt circa 75 Millionen Menschen in den USA, Europa und Japan. In den USA und Europa werden pro Jahr 2,3 Millionen Frakturen durch Osteoporose verursacht, die damit jährliche Kosten von mehr als 23 Milliarden Dollar entstehen lassen. Zusätzlich ist bei weiter ansteigender Lebenserwartung mit einer Verdopplung der durch Osteoporose verursachten Frakturen in den nächsten 50 Jahren zu rechnen (**2, 37, 38**).

1.1.1 Die zentrale Bedeutung des OPG/RANK/RANKL-Systems im Knochenstoffwechsel

Als einer der bedeutendsten Regulationsmechanismen des Knochenstoffwechsels konnte vor einiger Zeit das RANK/RANKL/OPG-System identifiziert und beschrieben werden (**39, 40**). Dieses gehört zur großen Gruppe der TNF-Rezeptor Superfamilie (TNFRSF_11B). Zwei voneinander unabhängig arbeitende Forschergruppen entdeckten ein „knochenschützendes“ Molekül und bezeichneten es als Osteoprotegerin (OPG). Synonyme für OPG, wie OCIF, TR-1 oder FDRC-1 sind darüber hinaus von anderen Gruppen definiert worden (**41-43**). Die Analysen ihrer Gensequenzen ergaben jedoch ein identisches Muster.

Das OPG-Protein ist ein posttranslational modifiziertes circa 55 kDa großes Glykoprotein, welches als 20 kDa Homodimer aus dem Osteoblasten sezerniert wird. Es beinhaltet drei strukturelle Domänen, die die biologischen Aktivitäten spezifisch beeinflussen können. Die erste Domäne ist cysteinreich und N-terminal lokalisiert. Sie ist sowohl für die Hemmung der Osteoklastogenese als auch für die Dimerisierung von OPG via Cys⁴⁰⁰ verantwortlich. Die zweite Domäne ist eine heparinbindende, welche Interaktionen mit Proteoglykanen einzugehen in der Lage ist. Sie befindet sich am C-Terminus von OPG. Die dritte Domäne zeigt Homologien mit so genannten Todesdomänen („Death Domain Homologous“). Dies sind Proteinabschnitte, die Übereinstimmungen mit zytoplasmatischen Regionen von Apoptose-induzierenden-Mediatoren wie TNFR-1, DR3, CD95/Fas oder TRAIL aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Domäne des OPG ein apoptotisches Signal induziert, wenn sie mit Fas fusioniert (**16**). Auf Transkriptionsebene konnten drei verschiedene mRNA-Varianten von 2,4 kb, 4,2 kb und 5,6 kb mittels Northernblot-Analysen aufgedeckt werden, von denen die Bande bei 2,4 kb

dem konstitutiv exprimierten Transkript entspricht. Die beiden anderen Transkripte repräsentieren alternative Spleißformen, die ein lösliches Molekül codieren (41).

OPG wird von vielen Organen und Organsystemen wie Knochen, Lunge, Niere, Intestinum, kardiovaskuläres System und dem Immunsystem produziert (39, 43, 44). Die Expression und Produktion ist dabei durch verschiedene Zytokine, Peptide, Hormone und Medikamente reguliert. TNF- α , IL-1, IL-18, BMP, Steroidhormone oder Phytoestrogene erhöhen die Expression der OPG-mRNA. Hingegen inhibieren Glukokortikoide, Cyclosporin A, PTH oder PGE₂ die OPG-Expression auf Transkriptions- und Proteinebene (45-56).

Kurze Zeit nach Entdeckung des OPG wurde von Yasuda et al. der entsprechende Ligand identifiziert und vorerst als OPG-L bezeichnet. Dieses Molekül stimmte mit den beiden zuvor entdeckten und beschriebenen Molekülen TRANCE und RANKL in den Gensequenzen überein (57). Von RANKL existieren drei Isoformen: RANKL1 und RANKL2 codieren die transmembran gebundene Form von RANKL. RANKL3 stellt das lösliche oder auch sRANKL dar und kann durch eine enzymatische Reaktion mit TACE (TNF- α converting enzyme) vom membrangebundenen RANKL abgespalten werden (58, 59). Die membrangebundenen Formen von RANKL werden hauptsächlich von Osteoblasten und Stromazellen exprimiert. Im Gegensatz dazu sezernieren aktivierte T-Zellen sRANKL. Die Expression von RANKL wird wiederum von unterschiedlichen Zytokinen (IL-1, IL-6, IL-11, TNF- α), Glukokortikoiden oder PTH moduliert (17). Da RANKL nicht nur von Osteoblasten, sondern auch von aktivierten T-Zellen produziert wird, ist bei Patienten mit überschießendem Immunsystem, wie der rheumatoiden Arthritis oder Hepatitis C, die Osteoklastenformation gesteigert, weshalb die betroffenen Patienten im Laufe der Zeit eine Osteoporose entwickeln können.

Das dritte wichtige Molekül in diesem bedeutsamen System des Knochenstoffwechsels identifizierten Anderson et al. Es stellt den Rezeptor von RANKL dar und wird als RANK bezeichnet. RANK ist ein transmembranöses Protein mit großer C-terminaler intrazytoplasmatischer und N-terminaler extrazellulärer Domäne. Eine lösliche Form wurde bisher nicht beschrieben (60).

In Abbildung 1 ist die Regulation der Osteoklastogenese mit Fokus auf das OPG/RANKL/RANK-System illustriert. Bei der Zell-zu-Zell-Interaktion im Knochenstoffwechsel bindet RANKL, welches auf der Oberfläche von aktivierten T-Lymphozyten, Stromazellen und Osteoblasten exprimiert wird, an seinen Rezeptor RANK. RANK selbst wird auf der Zelloberfläche von hämatopoetischen Osteoklastenvorläuferzellen, aber auch auf reifen Osteoklasten exprimiert. Darüber hinaus wird die Bildung von RANK durch M-CSF, das an spezifische Rezeptoren der Osteoklastenvorläuferzellen bindet, induziert. Die Fusion von RANKL mit RANK führt zu einer Reihe von Signalkaskaden und schließlich zur Expression spezifischer Gene, die in die Differenzierung und Aktivierung des Osteoklasten und sein Überleben involviert sind. Diese Signalkaskaden schließen die Aktivierung von TNFR assoziierten Faktoren (TRAF1-6) ein und führen zur verstärkten Expression von Transkriptionsfaktoren wie NF κ B, JNK, p38, NFAT, ERK oder MAPK (61). Aus der aktivierten Osteoklastogenese resultiert schließlich eine verstärkte Knochenresorption. Gleichzeitig kann RANKL auch die Apoptose des reifen Osteoklasten inhibieren.

Die biologischen Effekte des OPG sind den RANKL-vermittelten knochenabbauenden Prozessen entgegengesetzt. In diesem Zusammenhang agiert OPG als löslicher Rezeptorantagonist und verhindert durch die spezifische und hochaffine Bindung an RANKL eine RANKL-RANK-Interaktion.

Konsekutiv bleibt die Differenzierung der Osteoklastenvorläuferzelle und deren Aktivierung zum reifen Osteoklasten aus. Ferner induziert OPG selbst die Apoptose reifer Osteoklasten (57).

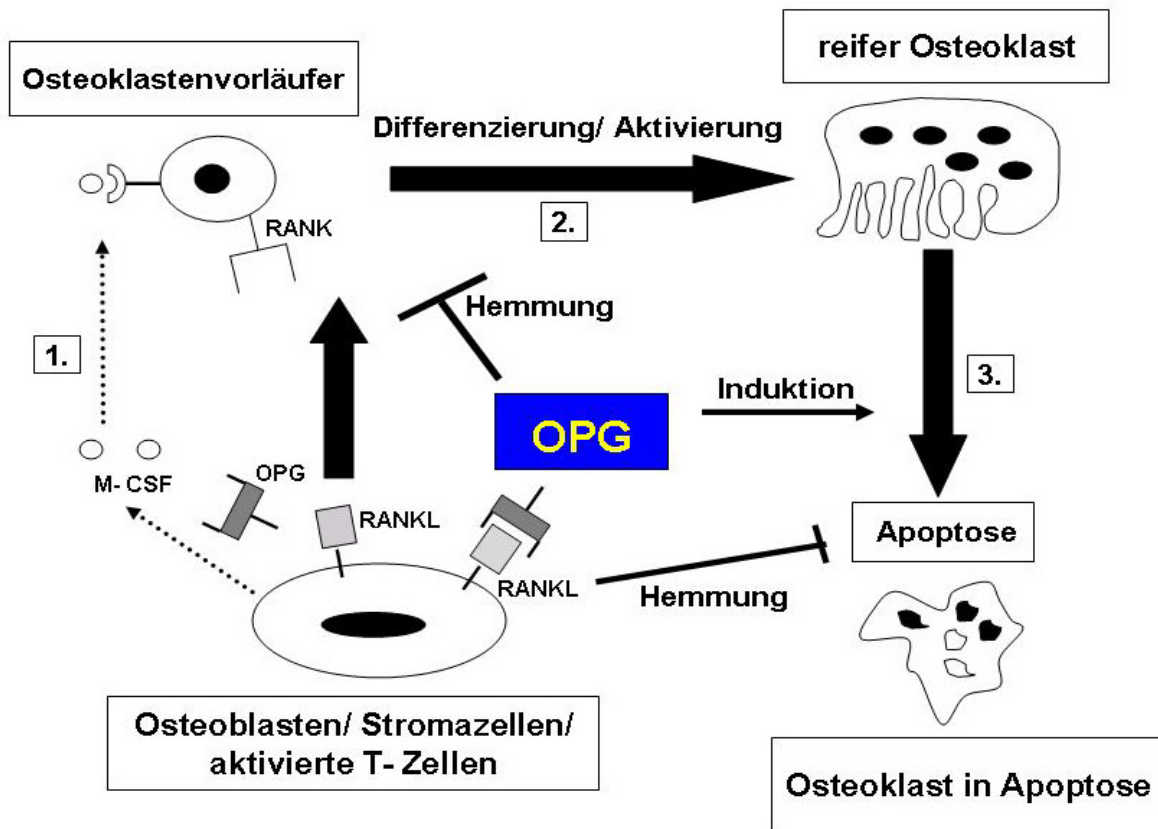


Abb. 1: Regulation der Osteoklastogenese, modifiziert nach Aubin et al. (62); Erläuterungen siehe Text

Durch Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass transgene Mäuse, welche OPG überexprimierten, eine Osteopetrose und „OPG-knock out“-Mäuse eine Osteoporose entwickelten. Invers verhält es sich mit RANKL und RANK. „Knock out“-Mäuse für das RANKL- und RANK-Gen wiesen eine Osteopetrose auf (39, 63, 64). Das Verhältnis von RANKL zu OPG determiniert schließlich den Grad der Knochendestruktion. Normale Stromazellen oder Osteoblasten produzieren eine stabile RANKL/OPG-Ratio, die für einen ausgewogenen Knochenumsatz („Remodelling“) verantwortlich ist (62).

Diese Ergebnisse bestätigen das OPG/RANKL/RANK-System als ein essentielles parakrin-regulatorisches Zytokinnetzwerk im Knochenmetabolismus.

1.1.2 Die Arachidonsäurekaskade und ihre Bedeutung im Knochenstoffwechsel

Destruktive Veränderungen des Knochengewebes werden durch den Anstieg proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 oder TNF- α und durch das Ungleichgewicht zwischen OPG und RANKL vermittelt. Es kommt nicht nur zu einem ständigen Abbau des subchondralen Knochens sondern auch zu einer systemischen Entzündungsreaktion, wie bei der RA, mit daraus resultierender Osteoporose (65). Wichtige Entzündungsmediatoren sind Eicosanoide, zu denen Prostaglandine, Prostazykline und Thromboxane gezählt werden. Die Bildung der Eicosanoide erfolgt im Arachidonsäurestoffwechsel, in welchem die Cyclooxygenase (COX) als Schlüsselenzym eine zentrale Rolle spielt (Abbildung 2).

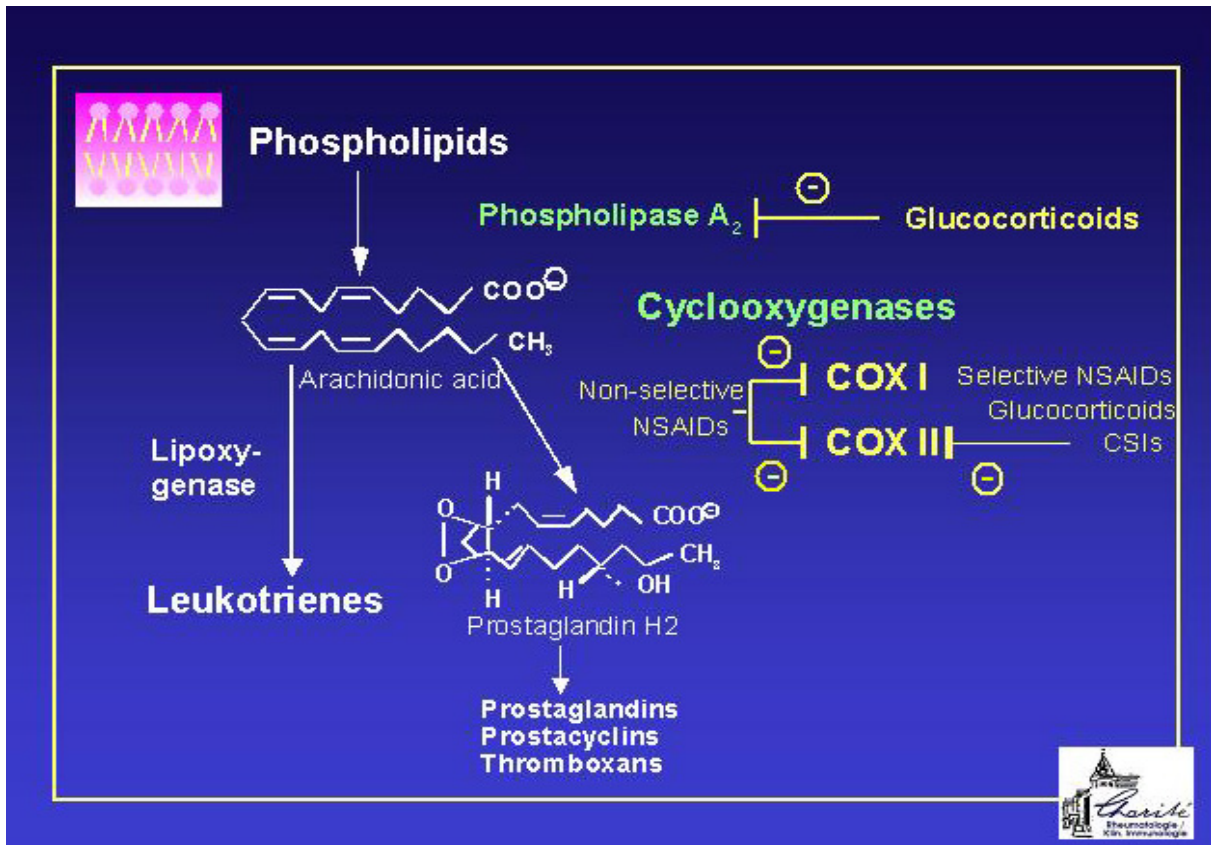


Abb. 2: Biosynthese der Prostaglandine im Arachidonsäurestoffwechsel nach Buttgeriet et al. (66)

In diesem Stoffwechsel wird durch die Wirkung des Enzyms Phospholipase A₂ aus Arachidonsäurehaltigen Membranphospholipiden Arachidonat abgespalten. Durch die Aktivität der Cyclooxygenasen entsteht in einem sauerstoffabhängigen Vorgang das Prostaglandin H₂ als Muttersubstanz für die Prostaglandine PGI₂, PGD₂, PGE₂, PGF_{2α} sowie das Thromboxan A₂. Im Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen spielt hauptsächlich PGE₂ eine wesentliche Rolle. Einerseits erhöht es durch seine vasodilatatorischen Eigenschaften den Blutfluss im Gewebe und provoziert dadurch die Überwärmung und Rötung. Zudem kommt es durch das Zusammenspiel mit anderen löslichen Faktoren wie Histamin oder Bradykinin zur erhöhten vaskulären Permeabilität, die einen extravasalen Flüssigkeitsaustritt mit resultierendem Ödem bzw. Ergusszunahme nach sich zieht. Darüber hinaus sensibilisiert es Nozizeptoren und führt somit zu einer Schmerzempfindung (Algesie). Schließlich stellt PGE₂ einen potenten pyretischen Mediator da und ist folglich für die Entwicklung von Fieber verantwortlich.

Eine alternative Modifikation der Arachidonsäure wird durch Lipoxygenasen erzeugt. Sie katalysieren die Biosynthese der Leukotriene, welche ebenfalls bei Entzündungsreaktionen von Relevanz sind.

Die antiinflammatorischen, antipyretischen und analgetischen Effekte der NSAIDs, wie Aspirin, Indomethacin, Ibuprofen oder Diclofenac, beruhen auf der Funktionshemmung der COX. Sie verhindern dadurch die Biosynthese der Prostaglandine. Diese Medikamente rufen jedoch auch zum Teil erhebliche Nebenwirkungen wie z.B. Magen- und Darmulcera, Thrombozytopenien oder respiratorische Komplikationen hervor.

Anfang der 90er Jahre postulierten Needleman et al. die Existenz von zwei Isoenzymen der COX, einer konstitutiven Form (COX-1) und einer induzierbaren Form (COX-2). Die Aktivierung der COX-2 erfolgt vorrangig durch inflammatorische Stimuli. Ebenso wird sie in einigen Körpergeweben aber auch konstitutiv exprimiert. Diese Entdeckungen halfen unter anderem bei der Aufklärung der Mechanismen der NSAIDs, die zu den aufgezählten Nebenwirkungen führen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass viele Nebenwirkungen durch Inhibition der COX-1 hervorgerufen werden. Andererseits ist die selektive Hemmung der COX-2 für den antiinflammatorischen Effekt verantwortlich. Es kam schließlich zur Entwicklung selektiver COX-2-Inhibitoren, die als antiinflammatorische Substanzen weniger Magen-Darm-Nebenwirkungen als NSAIDs zeigen. Einer dieser Inhibitoren ist Celecoxib (Celebrex®), ein diaryl-substituiertes Pyrazolderivat **(67-69)**.

Neben diesen bekannten Effekten der COX-2-Inhibitoren sind in epidemiologischen Studien auch präventive und chemotherapeutische Wirkungen bei der Entstehung und Behandlung des Kolonkarzinoms beschrieben worden. Beispielweise konnte für Celecoxib gezeigt werden, dass es die Anzahl und Größe kolorektaler Polypen bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) reduzierte und somit dem Risiko der Krebsentstehung vorbeugte. Über welchen möglichen Mechanismus NSAIDs eine Regression des Kolonkarzinoms bewirken, konnte bisher jedoch nicht endgültig geklärt werden. Sowohl COX-2-abhängige als auch COX-2-unabhängige Kaskaden werden bezüglich einer Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion der Zellen diskutiert **(70-75)**.

Ferner sind derzeit viele Diskussionen, die sich mit dem kardiovaskulären Sicherheitsprofil der Coxibe beschäftigen, im Gange. Belton et al. zeigten, dass COX-2-Inhibitoren die Produktion des vaskulären Prostazyklin (PGI₂) reduzierten und dadurch das Gleichgewicht zwischen prothrombotischen und antithrombotischen Eikosanoiden veränderten. Die Balance, die zu Gunsten des prothrombotischen Thromboxan A₂ abwich, führte schließlich zu verstärkten kardiovaskulären thrombotischen Ereignissen **(76)**. Auch ergaben vorläufige Auswertungen der „APC“-Studie („Adenoma Prevention with Celecoxib Trial“), bei welcher die präventive Wirkung des Celecoxib bezüglich kolorektaler Adenome untersucht wurde, einen dosisabhängigen Anstieg kardiovaskulärer Zwischenfälle **(77)**. Diese Ergebnisse sorgen derzeit immer wieder dafür, dass die Indikationsstellungen der Coxibe neu überdacht werden.

Dagegen konnte jedoch in der großen randomisierten „CLASS“-Studie („Celecoxib Longterm Arthritis Safety Study“) kein Anhalt für das erhöhte Risiko von Myokardinfarkten nach Celecoxibeinnahme bei Arthritis-Patienten gezeigt werden **(78)**. Eine jüngst publizierte retrospektive Studie von White et al. bestätigte diese initialen Beobachtungen bei nahezu 8000, in die Studie eingeschlossenen, Patienten. Sie erhielten Valdecoxib, einen COX-2-Inhibitor mit noch höherer Selektivität als Celecoxib, zur Behandlung der Osteoarthritis oder rheumatoiden Arthritis. Hinsichtlich des Auftretens von Myokardinfarkten fand sich beim Vergleich von Valdecoxib mit NSAIDs keine erhöhte Inzidenz nach der Valdecoxibeinnahme **(79)**. In einer klinisch experimentellen Doppelblindstudie untersuchten Chenevard et al. die Veränderungen der endothelialen Funktion nach Celecoxibeinnahme bei vierzehn männlichen Patienten mit KHK. Hierbei verbesserte Celecoxib die endothelabhängige Vasodilatation der Koronararterien signifikant gegenüber der mit Placebo behandelten Patientengruppe. Darüber hinaus konnte Celecoxib die chronische Entzündungsreaktion und den oxidativen Stress in den betroffenen Koronararterien vermindern **(80)**.

In der Knochenzellbiologie stellen Prostaglandine potente Regulatoren dar. Sie werden von Osteoblasten produziert und über lokale und systemische Mediatoren in einem „Feedbacksystem“ funktionell gesteuert. Im Rahmen inflammatorischer Geschehnisse, wie bei der RA, werden verstärkt Prostaglandine durch eine Induktion der COX-2-Expression bei gleichzeitigem Vorhandensein des Arachidonsäuresubstrates ausgeschüttet. PGE₂ kann hierbei eine erhöhte Knochenresorption durch die gleichzeitig verstärkte Induktion der RANKL-Expression in Osteoblasten verursachen. Ferner wird die Wirkung von RANKL auf Osteoklastenvorläuferzellen durch die Hemmung von GM-CSF verstärkt. Weiterhin können Wachstumsfaktoren oder proinflammatorische Zytokine (z.B. TNF- α , IL-1), die durch Lymphozyten ausgeschüttet werden, zum Abbau von Knochen- und Knorpelgewebe führen. Dieser Abbau wird durch von Knorpel- und Synovialzellen produzierte Kollagenasen induziert. Schließlich resultiert wiederum eine verstärkte Osteoklastogenese durch die Aktivierung von RANKL. Untersuchungen mit Indomethacin ergaben, dass dieser Effekt über die Vermittlung von PGE₂ inhibiert werden kann (36, 81, 82).

Prostaglandine können durch ihre Wirkung jedoch nicht nur den Knochenabbau provozieren. Sie sind auch in die Frakturheilung integriert. Signifikant erhöhte PGE₂ Level konnten in der Umgebung von heilenden Frakturen nachgewiesen werden (83).

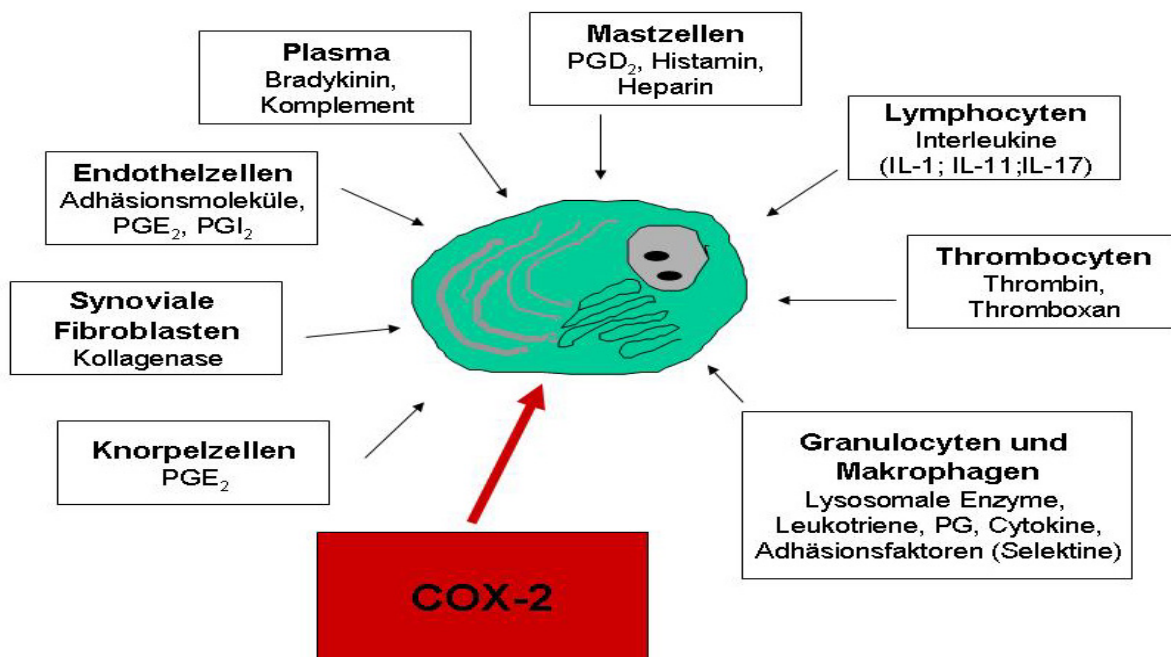


Abb. 3: Einwirkungen inflammatorischer Mediatoren auf Osteoblasten nach Buttgerit et al. (66)

Eine antiphlogistische Wirkung existiert auch für Glukokortikoide, wie beispielsweise Dexamethason. Es inhibiert die Phospholipase A₂ durch die vermehrte Synthese von Lipocortin 1, einem Hemmstoff der Phospholipase A₂. Daraus resultiert eine verringerte Arachidonsäurefreisetzung mit konsekutiv verminderter Prostaglandinsynthese. Außerdem können Glukokortikoide die Expression der COX-2 direkt hemmen, was wiederum zu einem Abfall der Prostaglandine mit verringerter Entzündungsreaktion führt (84).

1.1.3 Humane Osteoblasten und die Osteosarkomzelllinie MG-63 als Modellsysteme

Der Erkenntniszuwachs in der Knochenzellbiologie konnte durch geeignete *in vitro* Modellsysteme erreicht werden. Es gelang die Charakterisierung humaner Osteoblasten und die Analyse der Differenzierungsphasen in Zellkultursystemen. Nach Stein et al. beginnen Osteoblasten in der Zellkultur mit einer ungefähr 12 Tage andauernden initialen Proliferationsphase, welche durch die temporäre Sekretion spezifischer Proteine wie Fibronectin oder Prokollagen Typ I gekennzeichnet ist. Mit Hilfe dieser Proteine wird die Bildung der extrazellulären Matrix ermöglicht. In der Zeit von neun weiteren Tagen wird die extrazelluläre Matrix einer Reihe von Modifikationen unterzogen, wobei der biochemische und Osteoblasten-spezifische Marker alkalische Phosphatase seine maximale Expression erreicht. Im Anschluss kommt es zur Mineralisierung der Matrix mit der Expression wichtiger Gene, wie Osteocalcin, Osteopontin oder Proteoglykanen **(85, 86)**.

Für die Gewinnung der Knochenzellkultur aus Operationsmaterialien sind verschiedene Verfahren etabliert worden. Einerseits ist die Isolierung von Osteoblasten nach mechanischer Zerkleinerung und Spülung der Spongiosafragmente mit anschließender enzymatischer Kollagenasedissektion der Spongiosaoberfläche beschrieben worden. Andererseits gibt es auch die Möglichkeit, die zerkleinerten Spongiosafragmente ohne enzymatischen Verdau in entsprechenden Kulturgefäßen zu kultivieren. Dieses zweite Verfahren stellt ein optimales Zellkulturmodell für die Untersuchungen von physiologischen und pathophysiologischen Verhältnissen humaner Osteoblasten dar und fand in der vorliegenden Arbeit seine Anwendung **(87, 88)**. Ferner ergaben Untersuchungen, dass während der Kultivierung humaner Osteoblasten bestimmte Medienzusätze notwendig sind, um die bereits erwähnte Phase der Matrixmineralisierung einzuleiten. Zu diesen Zusätzen gehören Glukokortikoide, β -Glycerolphosphat und L-Ascorbinsäure **(88)**. L-Ascorbinsäure dient als Co-Faktor bei der Hydroxylierung der Aminosäuren Prolin und Lysin, welche im Kollagen zu finden sind. Außerdem bewirkt Ascorbinsäure eine Zunahme der Synthese nicht-kollagener Proteine der Knochenmatrix. Wegen der Instabilität des Vitamin C bei 37°C wird im Medium oft auch das stabilere Analogon L-Ascorbinsäure-2-phosphat (AsAP) verwendet **(89)**. Da AsAP per se schon eine Mineralisierung der Matrix fördert, wurde es in dieser Arbeit ohne Anwesenheit von Glukokortikoiden und β -Glycerolphosphat eingesetzt **(85, 90)**. Nach erfolgter erster Zellpassage konnten die Zellen als primäre humane Osteoblasten (phOB) bezeichnet werden **(85)**.

Neben humanen Osteoblastenzellkulturen, welche die *in vivo* Verhältnisse der Knochenzellbiologie bestmöglich reflektieren sollen, sind auch humane Osteosarkomzelllinien seit vielen Jahren Gegenstand von Zellkulturexperimenten. Sie wurden primär aus Tumorgewebe isoliert und als Monolayerkulturen etabliert. Ihre Kultivierung erfolgt nach Spülung, Gewebedissektion, enzymatischer Zellseparation und Zentrifugation. Nach weiterer Subkultivierung erhält man homogene Zellpopulationen, welche ihre funktionellen Eigenschaften auch über längere Kultur- und Passagezeiträume hinweg behalten. Das rasche Zellwachstum führt schneller zum Erreichen hoher Zelldichten als dies bei nicht entarteten primären Kulturen der Fall ist.

Aufgrund oft bestehender abnormaler Zellwachstumscharakteristika bei Osteosarkomzelllinien ist es nicht immer möglich, diese mit nativen Osteoblastenkulturen zu vergleichen und die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen auf die realen Verhältnisse zu übertragen. Darüber hinaus beinhalten primäre Osteoblastenzellkulturen heterozygote Zellpopulationen sowie unterschiedlich nebeneinander

entwickelte Zellreifstadien. Trotz dieser Beschränkungen können humane Osteosarkomzelllinien zum Verständnis der Osteoblastenfunktionen beitragen, da sie bestimmte spezifische osteoblastäre Entwicklungs- und Differenzierungsphasen bzw. -eigenschaften repräsentieren **(91)**.

In der vorliegenden Arbeit wird mit der über die ATCC bezogene Osteosarkomzelllinie MG-63 gearbeitet. Ursprung dieser Zelllinie sind Zellen, die in den 70er Jahren aus dem Osteosarkom eines 14 jährigen kaukasischen Patienten isoliert wurden **(92)**. In Kultur gebracht, wachsen die Zellen dieser Linie adhären und haben eine fibroblastische Morphologie. Sobald die Zellen Konfluenz erreichen und in „Monolayer-Formation“ vorliegen, beginnen sie sich aufzuschichten und unregelmäßig übereinander zu wachsen. Dieses charakteristische Phänomen wird in der Zellkulturterminologie als „Multilayer“ bezeichnet. Die MG-63 Zellen zeichnen sich durch schnelles Wachstum mit hoher Verdopplungsrate (38 h) und dem Fehlen von Kontaktinhibition, d.h. einem Teilungs- und Wachstumsstop nach Erreichen der Konfluenz, aus **(93)**. Aufgrund des umfangreich charakterisierten osteoblastischen Phänotyps wurde der MG-63 Zellklon schon häufig für verschiedene Fragestellungen der Physiologie und Pathophysiologie des Knochenstoffwechsels genutzt **(45, 47, 94-97)**.

In der vorliegenden Arbeit erfolgt die Kultivierung sowohl der pHOB als auch der Osteosarkomzelllinie MG-63 bis zum Zeitpunkt der Präinkubation im serumhaltigen Medium, um die Zellen ausreichend mit Nährstoffen zu versorgen. Jedoch ist Zellwachstum im serumhaltigen Medium durch die qualitativen und auch quantitativen Schwankungen der Seren schlecht standardisierbar. Mittlerweile ist es jedoch möglich, Zellen im serumfreien Medium zu kultivieren und ein Arbeiten unter kontrollierten und definierten Bedingungen zu ermöglichen **(98)**. Daher war die gemeinsame Endstrecke der Behandlung beider Zellpopulationen die Präinkubation mit BSA-haltigem, aber serumfreiem Medium. Die ausreichende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen ist dadurch gewährleistet **(45, 46, 48)**. Zudem wurde phenolrotfreies Medium verwendet, da phenolrothaltiges Medium östrogenartig auf kultivierte Zellen wirkt und den Erhalt von validen Ergebnissen gefährden kann **(85)**.

1.2 Aerobe und anaerobe Energieversorgung der Zelle

Die zelluläre Gewinnung von Energie in Form von ATP kann durch zwei unterschiedliche Stoffwechselvorgänge (aerob und anaerob) erfolgen. Unter aeroben Bedingungen gewinnen die meisten Zellen den größten Teil der von ihnen benötigten Energie durch Kopplung der sauerstoffabhängigen Reoxidation reduzierter wasserstoffübertragender Coenzyme mit der Bildung von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat. Dieser in der mitochondrialen Innenmembran lokalisierte Vorgang wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet. Eine andere Möglichkeit der ATP-Generierung stellt der Abbau von Glukose über die Glykolyse da. Sie kann sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Verhältnissen ablaufen. Sind die Bedingungen anaerob, so entsteht Laktat. Elf verschiedene Enzyme katalysieren in einer Reaktionssequenz die Bildung dieses Metaboliten. Dabei entsteht eine Ausbeute von 2 mol ATP pro Glukosemolekül. Unter aeroben Verhältnissen ist die Energiebilanz wesentlich günstiger, da das gebildete NADH mit Sauerstoff in der Atmungskette reoxidiert und das Endprodukt Pyruvat über den Zitronensäurezyklus zu CO₂ und H₂O abgebaut werden kann. Der aerobe Glukoseabbau liefert dann maximal 36-38 mol ATP pro Molekül Glukose.

1.2.1 Die Regulation des Glukosestoffwechsels über spezifische Transportproteine

Glukose ist aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften nicht in der Lage, die Zellmembran durch einfache Diffusion zu passieren und deshalb auf spezielle Carrier angewiesen, die den zytosolischen Transport garantieren. Neben einem sekundär aktiven, natriumabhängigen Glukosetransport existiert auch ein ubiquitär vorkommendes Transportsystem durch erleichterte Diffusion, welches der GLUT-Familie entspricht (99). Man kennt insgesamt 13 verschiedene Glukosetransporter (GLUT-1 bis GLUT-12 und HMIT), die sich mit jeweils 12 hydrophoben Transmembrandomänen in der Zytoplasmamembran anordnen (100). Die physiologischen Funktionen der einzelnen Transporter hängen von ihrer Kinetik und Substratspezifität ab. Die am besten beschriebenen Modelle der GLUT-Expression und -Regulation sind GLUT-1 und GLUT-4. Der Glukosetransporter GLUT-1 kommt in allen Geweben vor und ist für die basale Glukoseaufnahme von Bedeutung. In Kardiomyozyten konnte eine Erhöhung der GLUT-1-mRNA-Expression nach längerfristiger Ischämie gezeigt werden (101). GLUT-4 ist für die Regulierung der Glukoseaufnahme durch Insulin verantwortlich, indem das Transportprotein nach Bindung an intrazelluläre Vesikel in die Plasmamembran transloziert werden kann. Laktat, welches während des Glukoseabbaus unter hypoxischen Bedingungen entsteht, konnte die Translokation von GLUT-1 und GLUT-4 in die Plasmamembran über eine PI3K unabhängige Kaskade induzieren (102). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass bestimmte GLUT-mRNAs wie die der GLUT-1 oder GLUT-4 unter ischämischen oder hypoxischen Bedingungen verstärkt exprimiert werden, um die Glukoseaufnahme zu steigern. Somit kann die Energieversorgung der Zelle mit ATP über den Weg der anaeroben Glykolyse aufrechterhalten werden.

Unabhängig von hypoxischen Zuständen konnte durch Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung ebenso eine erhöhte GLUT-1-mRNA-Expression nachgewiesen werden (103). Insofern lässt eine erhöhte GLUT-1-mRNA-Expression nicht unbedingt den Schluss auf den Status einer zellulären Hypoxie zu.

1.2.2 HIF-1 α als Hypoxiemarker und seine Bedeutung für die Entstehung der Rheumatoiden Arthritis

Hypoxische Zustände verursachen eine Vielzahl von Veränderungen auf zellulärer Ebene. Durch die Reduktion des Sauerstoffangebotes kommt es beispielsweise im betroffenen Gewebe zu einer verstärkten vaskulären Proliferation (104-107). Ein wichtiges Regulatormolekül bei dieser hypoxischen Zellantwort stellt der Transkriptionsfaktor HIF dar. HIF ist ein Heterodimer und besteht aus zwei Untereinheiten, HIF-1 α , dessen Expression durch Hypoxie induziert wird und HIF-1 β , welches konstitutiv und unabhängig von hypoxischen Zuständen exprimiert wird. Unter normoxischen Bedingungen bindet HIF-1 α nach sauerstoffabhängiger Modifikation durch eine Prolylhydroxylase an das Von-Hippel-Lindau-(VHL-)Protein und erfährt die proteasomale Degradation über den Ubiquitinweg. Verantwortlich für den Abbau im Proteasomenkomplex ist eine im Protein befindliche, sauerstoffabhängige Degradationsdomäne. Bei einer Sauerstoffsättigung von weniger als 5% wird HIF-1 α stabilisiert und in den Nukleolus transloziert, wo es mit HIF-1 β dimerisiert und an so genannte hypoxieregulierte Gene (HREs) bindet. Es sind über 30 verschiedene HIF-1 α regulierte Gene wie beispielsweise VEGF, EPO, GLUT-1, LDH, PFKL oder HK beschrieben. Durch ihre verstärkte Transkription werden daraufhin die entsprechenden Proteine sezerniert, die unter anderem eine

Steigerung der Erythropoese und Angiogenese oder auch das Umschalten auf einen glykolytischen Stoffwechsel bewirken.

Die Induktion von HIF kann aber auch durch mechanischen Stress oder in geschwollenen Gelenken mit konsekutiv erhöhten intraartikulären Drücken, wie z.B. bei der RA, resultieren. Es kommt zur Aktivierung der PI3K/AKT/FRAP-Kaskade, welche die Translation von HIF-1 α verstärkt. Eine andere Möglichkeit der Phosphorylierung von HIF-1 α besteht über den RAF/MEK/MAPK-Kinase-Weg. Dieser führt zu einer Verstärkung der transkriptionalen Aktivität von HIF-1 α **(108)**.

Bei Patienten mit RA oder Arthrose fanden sich nach immunhistochemischer Färbung in synovialen CD68⁺ Makrophagen und Stromazellen erhöhte HIF-1 α Spiegel **(109)**. Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass durch das Ausschalten von HIF-1 α eine gelenknahe Knorpelzerstörung, Gelenkschwellungen und Formationen von Pannusgewebe in einem induzierten Arthritismodell gestoppt werden können **(110)**.

Ein charakteristisches Merkmal des Entzündungsgeschehens bei RA ist die Migration von Effektorzellen, z.B. Monozyten und Lymphozyten, in das Pannusgewebe. Stromazellen exprimieren Faktoren wie SDF-1, die bei Hypoxie und HIF-1 α -Anwesenheit eine verstärkte Rekrutierung und synoviale Ansammlung dieser Effektorzellen verursachen **(111)**. Ein weiteres pathologisch bedeutsames Merkmal der RA ist das verstärkte Einsetzen der Angiogenese. Sie ist ein mehrstufiger Prozess, der zu endothelialer Zellaktivierung und erhöhter Gefäßpermeabilität führt. Durch HIF werden verstärkt proangiogene Faktoren wie VEGF oder Tie-2 exprimiert, die zur Bildung neuer Kapillaren führen. Die Inhibition des Angiogeneseprozesses in entzündeten Gelenken bei verschiedenen RA-Modellen kann in diesem Zusammenhang den Rückgang einer Arthritis bewirken, was wiederum die Rolle von HIF als Schlüsselmolekül unterstreicht **(112, 113)**. Ferner können auch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 oder TNF- α , reaktive Sauerstoffradikale (ROS) oder bakterielle Lipopolysaccharide die Expression von HIF induzieren. Da die chronische RA häufig auch zur Entwicklung einer Osteoporose führt, lässt sich auch ein Einfluss von HIF hinsichtlich der Entstehung dieses Krankheitsbildes vermuten.

Bestimmte Medikamente, wie Ciclosporin A, Indomethacin, Ibuprofen oder der selektive COX-2-Inhibitor NS-398, die therapeutisch bei der RA eingesetzt werden, zeigten bei *in vitro* Versuchen eine Hemmung der hypoxieabhängigen Gentranskription und verhinderten dadurch die Akkumulation von HIF-1 α . Die Substanzen förderten die Hydroxylierung von HIF-1 α und bewirkten somit dessen Degradation über den Ubiquitin-Weg **(108)**.

1.2.3 Potentielle Inhibitoren der Atmungskette am Beispiel des Entkopplers FCCP

In der inneren Mitochondrienmembran läuft die sauerstoffabhängige Reoxidation der wasserstoffübertragenden Coenzyme NADH/H⁺ und FADH₂ ab. Dieser Vorgang erfolgt durch die Katalyse von insgesamt vier elektronentransportierenden Multienzymkomplexen. Die Komplexe I, III und IV sind imstande, die während des Elektronentransportes auftretende Änderung der freien Energie für den aktiven Transport von Protonen aus dem Matrixraum in den Intermembranraum der Mitochondrien zu nutzen. Dadurch wird eine elektrochemische Potentialdifferenz über die innere Mitochondrienmembran aufgebaut. Diese liefert die von der mitochondrialen F₁/F₀-ATPase für die ATP-Bildung benötigte Energie.

Einleitung

Spezifische Inhibitoren haben zur Aufklärung der Reaktionsfolge des Elektronentransportes sowie der oxidativen Phosphorylierung beigetragen. Sie werden entsprechend ihrem Wirkungsort bzw. Wirkungsweise in Hemmstoffe der Atmungskette, Hemmstoffe der oxidativen Phosphorylierung und Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung eingeteilt.

Die Wirkungsweise von Entkopplern, wie beispielsweise FCCP oder 2,4-Dinitrophenol (DNP), besteht darin, die Oxidationsvorgänge innerhalb der Atmungskette von Phosphorylierungsvorgängen abzutrennen. Als Resultat entwickelt sich eine gesteigerte Atmung, bei der das Angebot von ADP oder anorganischem Phosphat nicht länger die Atmungsgeschwindigkeit bestimmt. Entkoppler sind lipophile organische Verbindungen, die leicht protoniert oder deprotoniert werden können. Sie binden somit die durch die Multienzymkomplexe der Atmungskette auf die Außenseite der inneren Mitochondrienmembran transportierten Protonen und können diese aufgrund des Konzentrationsgradienten wieder in den Matrixraum der Mitochondrien zurück befördern. Schließlich kommt es zum Zusammenbruch des über der inneren Mitochondrienmembran aufgebauten elektrochemischen Potentials und trotz funktionierendem Elektronentransport zum Stopp der ATP-Bildung durch die oxidative Phosphorylierung. Die bei Neugeborenen im braunen Fettgewebe ablaufende Thermogenese zeichnet sich durch einen ähnlichen, allerdings natürlichen Mechanismus aus. Das durch cAMP induzierte Entkopplungsprotein Thermogenin stellt einen Protonencarrier da, der in die innere Mitochondrienmembran integriert ist und diese durchlässig für Protonen macht. Infolge dessen liefert der mitochondriale Elektronentransport nur noch Wärmeenergie **(114)**.

Untersuchungen zeigten, dass CCCP als ein strukturelles Analogon von FCCP den Glukosetransport durch verstärkten Einbau des Transporterproteins GLUT-1 in die Plasmamembran stimuliert **(115)**.

Neben der Einflussnahme selektiver COX-2-Inhibitoren auf die Prostaglandinsynthese konnten auch Effekte dieser Substanzen auf den zellulären Energiemetabolismus demonstriert werden. Mit der Applikation von SC-236, einem Vorläufermolekül des Celecoxib (SC-58635), ließ sich in isolierten Thymuszellen von Ratten eine Hemmung der Elektronentransportkette durch Entkopplung mit simultaner Inhibition der Substratoxidation und der ATP-Generierung nachweisen. Der Sauerstoffverbrauch war signifikant erhöht **(116)**.